



Канаев А.А.
2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к плазминогену человека в сыворотке крови (Анти Плазминоген-ИФА)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов Анти Плазминоген-ИФА предназначен для качественного определения иммуноглобулинов класса G к плазминогену человека (ПГЧ) в сыворотке крови методом твердофазного непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Плазминоген человека имеет важное значение в регуляции системы свертывания крови, а его метаболиты, такие как ангиостатин участвуют в процессе ангиогенеза. Ангиостатин является производным ПГЧ. Процесс канцерогенеза сопровождается значительной активацией специфических протеолитических ферментов в области опухоли - металлопротеаз, сериновых протеаз и др. Одной из основных протеаз, которая активируется в области опухоли является плазмин, который образуется при активации ПГЧ. Ответной реакцией организма на усиление активности плазмينا *in situ* является выработка специфических IgG (аутоантител) к ПГЧ, что позволяет снизить патологическую протеолитическую активность. В свою очередь специфические IgG к ПГЧ блокируют активность ангиостатина, что приводит к образованию новых сосудов в области опухоли и усилению кровоснабжения.

Было обнаружено, что при патологии предстательной железы высокое содержание IgG к ПГЧ в основном отмечается среди пациентов с раком предстательной железы (РПЖ). Качественное определение IgG к ПГЧ рекомендуется включать в обследование пациентов с РПЖ при первичном приеме у онкоуролога, а также для для оценки процесса лечения РПЖ.

1.3 Область применения – клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

2.1 Состав набора:

- Планшет полистироловый с иммобилизованным на поверхности лунок плазминогеном человека - 1 шт.;
- концентрат конъюгата моноклональных антител против IgG человека - 1 флакон (150 мкл);
- положительный контроль IgG - 1 туба (50 мкл);
- отрицательный контроль - 1 туба (50 мкл);
- промывочный буфер (20х концентрат) - 1 флакон (20 мл);
- буферный раствор для разведения проб, (готов к использованию) - 1 флакон (50 мл);
- буферный раствор для разведения конъюгата, (готов к использованию) - 1 флакон (12 мл);
- субстратный буфер H₂O₂ - 1 флакон (12 мл);
- тетраметилбензидин - 1 флакон (3,0 мл);
- стоп-реагент, (готов к использованию) - 1 флакон (12 мл);
- пленка самоклеящаяся для покрытия планшета - 1 шт.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов (сывороток крови), одной пробы положительного и одной пробы отрицательного контрольных образцов.

2.3 Принцип работы набора:

В основе определения наличия специфических иммуноглобулинов класса G к плазминогену человека лежит принцип твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), который включает

иммунологическую реакцию антиген-антитело по сэндвич-принципу и ферментативную реакцию, приводящую к развитию окраски субстратно-хромогенной смеси в зависимости от концентрации антител в анализируемых образцах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Чувствительность выявления иммуноглобулинов класса G к плазминогену – соответствие результатов определения набором IgG к плазминогену требованиям стандартной панели предприятия (СПП Анти Плазминоген «+»), аттестована ОТК ООО «Ангиоген» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с положительными сыворотками ОП $\geq$ ОП_{крит.}

3.2. Специфичность выявления иммуноглобулинов класса G к плазминогену – соответствие результатов определения набором IgG к плазминогену требованиям стандартной панели предприятия (СПП Анти Плазминоген «+»), аттестована ОТК ООО «Ангиоген» – составляет 100%: средние арифметические значения оптической плотности в лунках с отрицательными сыворотками ОП $<$ ОП_{крит.}

3.3 Диагностическая чувствительность *

3.4 Диагностическая специфичность *

* Дополнительно в данной инструкции будут приведены данные об оценке диагностических чувствительности и специфичности, полученные в ходе клинических испытаний данного набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1 Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2 Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Следует избегать его разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые; при попадании на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать правила, изложенные в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Москва, 1991 г.)

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- холодильник бытовой;
- термостат твердотельный или водяной, поддерживающий температуру $+35 \pm 0,1$ °C;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,1$ °C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5, 100, 500 и 1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 100 и 200 мкл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная;
- колба мерная вместимостью 1000 мл.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ:

В качестве анализируемых проб используются образцы сыворотки крови.

Образцы сывороток крови после взятия хранятся при 4 °С не более 24 часов. Допускается заморозка образцов сыворотки крови при температуре -20 °С для хранения в течение года. Разрешается однократное размораживание.

Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

7.1 Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение времени не менее 30 минут.

7.2 Положительные, отрицательный контроли и анализируемые образцы сыворотки крови предварительно разводят в 333 раза. Буферным раствором для разведения проб, путем внесения в 1000 мкл данного буферного раствора 3 мкл образца, затем тщательно перемешивают.

7.3 Приготовление рабочего раствора конъюгата.

Рабочий раствор конъюгата готовят путем разведения концентрата конъюгата буферным раствором для разведения конъюгата. В 12 мл буферного раствора для разведения конъюгата вносят 150 мкл КГ анти-IgG. Использовать в течение 1-2 часов, хранению не подлежит.

7.4 Приготовление рабочего раствора промывочного буфера.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл перенести содержимое флакона с концентратом промывочного буфера и довести дистиллированной водой объем до метки, перемешать. Рабочий раствор хранить при температуре 2-8 °С не более 7 дней или при температуре ниже -8 °С не более 30 дней.

7.5 Приготовление Субстратно-хромогенной смеси.

Субстратно-хромогенную смесь готовят за 5 минут перед использованием! Во флакон с субстратным буфером H₂O₂ внести содержимое флакона с раствором тетраметилбензидина и тщательно перемешать. Приготовленный раствор до использования хранить в темном месте.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1 Внести в соответствующие лунки планшета в дубликатах по 100 мкл подготовленных образцов отрицательного и положительного контроля. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл подготовленных ранее анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение положительных и отрицательного контролей и анализируемых образцов проводить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

8.2 Закрыть планшеты пленкой самоклеящейся и инкубировать в течение 60 мин при 37 °С.

8.3 По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки планшета 4 раза (используя 12-канальную полуавтоматическую пипетку), добавляя при каждой промывке во все лунки по 200 мкл рабочего раствора промывочного буфера с последующим декантированием. При каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Промывку лунок планшета можно проводить и при помощи прибора для промывания планшетов.

8.4 Внести во все лунки в той же последовательности, что и контроли и анализируемые образцы, по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

8.5 Закрыть планшет пленкой самоклеящейся и инкубировать в течение 30 мин при 37 °С.

8.6 По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки планшета 4 раза (используя 12-канальную полуавтоматическую пипетку), добавляя при каждой промывке во все лунки по 200 мкл рабочего раствора промывочного буфера с последующим декантированием. При каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Схема заполнения лунок планшета

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ОК		АП 7		АП 15		АП 23		АП 31		АП 39	
B	ПК_{IgG}		АП 8		АП 16		АП 24		АП 32		АП 40	
C	АП 1		АП 9		АП 17		АП 25		АП 33		АП 41	
D	АП 2		АП 10		АП 18		АП 26		АП 34		АП 42	
E	АП 3		АП 11		АП 19		АП 27		АП 35		АП 43	
F	АП 4		АП 12		АП 20		АП 28		АП 36		АП 44	
G	АП 5		АП 13		АП 21		АП 29		АП 37		АП 45	
H	АП 6		АП 14		АП 22		АП 30		АП 38		АП 46	

Примечание:

ОК – отрицательный контроль

ПК IgG – положительный контроль IgG

АП – анализируемые образцы

8.7 Внести во все лунки по 100 мкл субстратно-хромогенной смеси. Закрепить планшет пленкой самоклеящейся и инкубировать при 37 °С в течение 10 - 15 мин.

8.8 Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратно-хромогенную смесь по 100 мкл стоп-реагента.

8.9 Провести фотометрию при длине волны 450 нм сразу после остановки реакции.

9. РАСЧЕТ КОНТРОЛЬНЫХ ВЕЛИЧИН И ЗОНЫ Cut-off.

9.1 Среднее значение оптической плотности (ОП) отрицательного контроля (ОК) в лунках А1 и А2 и положительного контроля (ПК) в лунках В1 и В2 рассчитывается по формуле:

$$ОК = \frac{ОП_{(450)}(A1) + ОП_{450}(A2)}{2}$$

$$ПК = \frac{ОП_{(450)}(B1) + ОП_{450}(B2)}{2}$$

Значение уровня отсечения **Cut-off – серая зона (COV)**,

$$COV = ОК + (0,3 \times ОК)$$

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

1. $ОК \leq 0,5$
2. $ПК \geq 1,0$
3. $ПК - ОК \geq 0,5$

9.2 Интерпретация результатов

- Если $ОП_{450}$ в лунке с исследуемой сывороткой $\geq COV + 15 \%$, результат считается положительным.

- Если $ОП_{450}$ в лунке с исследуемой сывороткой $\geq COV - 15 \%$, результат считается отрицательным.

В силу физиологической и аналитической изменчивости, значения, лежащие в пределах 15% диапазона по обе стороны **Cut-off**, являются неопределенными (**серая зона**). Пациентам с образцами, показавшими неопределенный результат, рекомендуется повторно сделать анализ через 14 дней. Пациенты с положительными образцами относятся к группе риска при постановке диагноза РПЖ и рекомендованы для дальнейшего инструментального исследования.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ПРИМЕНЕНИЯ И УТИЛИЗАЦИИ НАБОРА

10.1 Набор реагентов Анти Плазминоген-ИФА должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.2 Набор реагентов Анти Плазминоген-ИФА можно транспортировать транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 5 суток.

10.3 Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 46 исследуемых образцов, одного положительного и одного отрицательного контрольных образцов.

10.4 В случае дробного использования набора компоненты следует хранить следующим образом:

- положительные и отрицательные контроли, концентрат конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С в течение срока годности набора;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 часов;
- буферный раствор для разведения проб можно хранить при температуре 2-8 °С в течение срока годности набора;
- буферный раствор для разведения конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С в течение срока годности набора;
- раствор субстратно-хромогенной смеси хранению не подлежит;
- неиспользованные стрипы после вскрытия пакета можно хранить в герметичных условиях при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности набора.

10.5 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

10.6 Исключается использование набора для анализа образцов крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

10.7 При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

10.8 Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.9 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора Анти Плазминоген-ИФА, следует обращаться в ООО «АНГИОГЕН», 101000, г. Москва, ул. Мясницкая д. 30/1/2, стр.2. Тел: (495) 789-06-05



Сшито и заверено печатью 5
(нет) лист об

Генеральный директор
ООО «Ангиоген»

Канаев А. А.

ООО «АНГИОГЕН»

ПАСПОРТ

Стандартная панель образцов сыворотки крови человека содержащих
иммуноглобулины класса G к плазминогену человека (ПГЧ)

СПП Анти Плазминоген «+»

Серия 01. Срок годности сывороток в панели до 26.11.2017 г.

Количество сывороток в панели: 10

Исследования проводились на наборе Анти Плазминоген-ИФА - производство ООО «АНГИОГЕН», серия 02, произведен 24.11.2016, срок годности набора до 24.05.2017 г. В образцах сывороток антитела к ВИЧ 1,2 и вирусу гепатита отсутствуют.

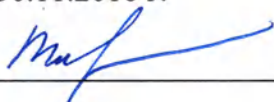
Наименование показателя	Требования НД	Результаты контроля
1. Описание	Жидкости светло-желтого цвета	Жидкости светло-желтого цвета
2. Объем розлива, мкл	50	50
3. Погрешность розлива, %	Не более 1,0	0,91
4. pH, ед	От 6,7 до 7,7	7,2±0,2
5. Специфическая активность	Образцы сыворотки должны содержать IgG к ПГЧ	Образцы сыворотки содержат IgG к ПГЧ

№ сыворотки	Оптическая плотность в ИФА	Требования НД	Шкала Глиссона	Диагноз	Титр в иммуноблоте
1	0,76	> 0,5	7	РПЖ* T1cNOMO	10 ⁴
2	1,68	> 0,5	7	РПЖ T1cNOMO	10 ⁵
3	0,97	> 0,5	7	РПЖ T2cNOMO	10 ⁵
4	1,72	> 0,5	7	РПЖ T3- 4NXM1	10 ⁵
5	1,16	> 0,5	7	РПЖ T2cNOMO	10 ⁵
6	1,66	> 0,5	7	РПЖ T1cNOMO	10 ⁵
7	1,12	> 0,5	7	РПЖ T1cNOMO	10 ⁴
8	1,41	> 0,5	7	РПЖ T1cNOMO	10 ⁵
9	1,22	> 0,5	7	РПЖ T2aNXMO	10 ⁵
10	1,24	> 0,5	7	РПЖ T1cNOMX	10 ⁵

*РПЖ - рак предстательной железы

Паспорт выдан: 30.11.2016 г.

Зав. ОТК




ООО «АНГИОГЕН»

ПАСПОРТ

Стандартная панель образцов сыворотки крови человека, не содержащих иммуноглобулины класса G к плазминогену человека

СОП Анти Плазминоген «-»

Серия 01. Срок годности сывороток в панели до 26.11.2017 г.
Количество сывороток в панели: 10

Исследования проводились на наборе Анти Плазминоген-ИФА - производство ООО «АНГИОГЕН», серия 02, изготовлен 24.11.2016, срок годности набора до 24.05.2017 г.

В образцах сывороток антитела к ВИЧ 1,2 и вирусу гепатита отсутствуют.

Наименование показателя	Требования НД	Результаты контроля
1. Описание	Жидкости светло-желтого цвета	Жидкости светло-желтого цвета
2. Объем розлива, мкл	100	100
3. Погрешность розлива, %	Не более 1,0	0,80
4. pH, ед	От 6,7 до 7,7	7,2±0,2
5. Специфическая активность	Образцы сыворотки не должны содержать IgG к ПГЧ	Образцы сыворотки не содержат IgG к ПГЧ

№ сыворотки	Ед. оптической Плотности в ИФА	Требования НД	Диагноз	Титр в иммуноблоте
1	0,44	< 0,5	Здоров	10 ¹
2	0,31	< 0,5	Здоров	10 ¹
3	0,39	< 0,5	Здоров	10 ¹
4	0,49	< 0,5	Здоров	10 ¹
5	0,32	< 0,5	Здоров	10 ¹
6	0,38	< 0,5	Здоров	10 ¹
7	0,34	< 0,5	Здоров	10 ¹
8	0,29	< 0,5	Здоров	10 ¹
9	0,45	< 0,5	Здоров	10 ¹
10	0,46	< 0,5	Здоров	10 ¹

Паспорт выдан: 30.11.2016 г.

Зав. ОТК _____

Н.Б. Тихонова

