

ЗМІСТ

1.	ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2.	ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	2
3.	АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4.	СКЛАД НАБОРУ	4
5.	ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6.	ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7.	ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8.	УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9.	ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10.	ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	9
11.	ЛІТЕРАТУРА	9

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО IgG В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ «Загальний IgG-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Загальний IgG-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації загального IgG в біологічних рідинах (див. таблицю М) методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Антитіла класу IgG переважають у складі фракції γ -глобулінів і є основним класом антитіл, присутніх у сироватці крові людини. Збільшення концентрації IgG у сироватці крові є основною ознакою зрілої імунної відповіді, а зниження їх концентрації нижче 5 г/л свідчить про розвиток важкого імунодефіциту. Визначення концентрації IgG у сироватці крові, як і співвідношення вмісту IgG/IgA/IgM може служити одним із основних критеріїв оцінки імунного статусу індивіда та використовуватися при контролі лікування деяких інфекційних захворювань. Різке підвищення концентрації IgG у сироватці крові спостерігається при мієломній хворобі.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення загального IgG ґрунтується на використанні «сендвіч»-варіанта твердофазного імуноферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізовані мишачі моноклональні антитіла проти загального IgG людини. У лунках планшета, при додаванні досліджуваного зразка, відбувається зв'язування загального IgG, який міститься в досліджуваному зразку, з антитілами на твердій фазі.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату мишачих моноклональних антитіл проти загального IgG з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації з розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації загального IgG в досліджуваному зразку. Концентрацію загального IgG в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту загального IgG в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність. Перехресна реакція мишачих моноклональних антитіл проти загального IgG з іншими аналітами наведена в таблиці:

Аналіт	Перехресна реакція, %
IgA	<0.1
IgM	<0.1
IgE	<0.1

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту загального IgG у тому самому зразку біологічних рідин з використанням Набору «Загальний IgG-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації загального IgG у зразках біологічних рідин при розведенні їх біологічними рідинами, що не містять загальний IgG, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 1-25 г/л та складає $\pm 10.0\%$

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації загального IgG підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 5.0 г/л. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначається Набором «Загальний IgG-ІФА» концентрація загального IgG-ІФА у біологічних рідинах не перевищує 0.06 г/л.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P271Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стрипований, готовий до використання	1	шт.	-
2	C271Z	CAL 1-5	Калібрувальні проби на основі трис-буфера (pH 7.2-7.4), що містять відомі кількості загального IgG – 0; 1; 5; 10; 25 г/л , готові до використання (по 1 мл кожна)	5	шт.	прозорі рідини синього кольору (калібрувальна проба С1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q271Z	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом загального IgG, готова до використання (1 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
4	T271Z	CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора рідина червоного кольору
5	SP271Z	DIL SPE	Буфер для розведення зразків , готовий до використання (100 мл)	1	шт	прозора рідина синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт.	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт.	-
10	K271I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «Загальний IgG-ІФА»	1	шт.	-
11	K271Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «Загальний IgG-ІФА»	1	шт.	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати ВІЛ, вірус гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 25–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. В разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «Загальний IgG-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 42 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних проб та 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- буфер для розведення зразків, кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, слід зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;
- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору.
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження: після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. В разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищені) результати.

8.6. Під час використанні Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного незалежного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або із аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів – із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторях та 12 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Розведіть зразки сироватки (плазми) крові в 5000 раз, використовуючи Буфер для розведення зразків (SP271Z). Приклад: в пробірку Розведення 1 (1: 99) додайте: 10 мкл зразка + 990 мкл Буфера для розведення зразків. В іншу пробірку Розведення 2 (1: 4999) додайте 10 мкл Розведення 1 + 4990 мкл Буфера для розведення зразків. Розведення 2 (1: 4999) слід використовувати в аналізі. Спосіб розведення для інших видів матеріалів наведених в таблиці М. Калібрувальні проби та контрольну сироватку розводити не потрібно!
3	Якщо передбачувана концентрація загального IgG в зразку для дослідження перевищує 25 г/л, його слід додатково розвести, використовуючи Буфер для розведення зразків (SP271Z). Використання інших буферів та реагентів для розведення зразків може призводити до помилкових результатів. Примітка: в такому випадку для отримання надійних результатів рекомендуємо використовувати декілька послдовних розведень досліджуваного зразка біологічних рідин.
4	Внесіть у відповідні лунки в двох повторях по 100 мкл кожної калібрувальної проби та контрольної сироватки. При дослідженні сироватки (плазми) крові в лунки, які призначені для досліджуваних зразків, внесіть по 100 мкл розбавлених зразків (Розведення 2). При дослідженні інших видів матеріалу об'єм зразка, який необхідно внести, вказаний в таблиці М. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 5-10 хв.
5	Обережно перемишайте вміст планшета круговими рухами по горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +37°C.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 3 рази. При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаліть рідину з лунок за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
8	Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета та інкубуйте його протягом 30 хвилин при температурі +37°C.
9	По закінченні інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів.
10	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет в темряві при кімнатній температурі (+18...+25 °C) протягом 10–20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
11	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послдовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту; при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.
12	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробою С1 або за повітрям.

продовження таблиці на стор. 8

13	Побудуйте в лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація загального IgG в калібрувальних пробах (г/л), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальный (відрізково-лінійний, «від точки до точки») метод.
14	Визначте за калібрувальним графіком вміст загального IgG в досліджуваних зразках. У разі попереднього розведення досліджуваного зразка (див. п.3), отриманий результат необхідно на фактор розведення. При дослідженні різних видів матеріалів необхідно домножити отримані значення на Фактор перерахунку, наведений в таблиці М.

Таблиця М

Вид матеріалу	Збір, зберігання та обробка матеріалу	Приклад розведення	Буфер для розведення зразків в лунку, мкл	Зразок в лунку, мкл	Фактор перерахунку
сироватка (плазма) крові	Зразки для дослідження необхідно ретельно центрифугувати. Аналіз непрозорих, гемолізованих зразків може призвести до помилкових результатів.	Розведення 1 (1:99): 10 мкл зразка + 990 мкл Буфера для розведення зразків. В іншу пробірку Розведення 2 (1:4999) додайте 10 мкл Розведення 1 + 490 мкл Буфера для розведення зразків. Розведення 2 (1:4999) слід використовувати в аналізі.	0	100	1
Слина	Зразки для дослідження необхідно ретельно центрифугувати. Аналіз непрозорих зразків може призвести до помилкових результатів.		90	10	0.002
Сеча	Зразки для дослідження необхідно ретельно центрифугувати. Аналіз непрозорих зразків може призвести до помилкових результатів.		50	50	0.0004
Спин-номозкова рідина	Зразки для дослідження необхідно ретельно центрифугувати. Аналіз непрозорих зразків може призвести до помилкових результатів.	10 мкл зразка + 500 мкл буфера для розведення зразків	0	100	0.01

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій загального IgG у досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (0.06 г/л), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (25 г/л) належить приводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація загального IgG нижча за 0.06 г/л» або «вища за 25 г/л».

Досліджувана група	Одиниці, г/л	
	Нижня межа	Верхня межа
Новонароджені	7.0	15
1-3 місяців	2.7	8.0
4-6 місяців	1.8	8.5
7-12 місяців	3.5	12
1-6 років	6.5	18
7-11 років	8.5	15
> 11 років	9.0	20

11. ЛІТЕРАТУРА

1. RG Hamilton – Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. Clin. Chem., Oct 1987; 33: 1707 – 1725.
2. V. A. Semenova, E. Steward-Clark, K. L. Stamey, T. H. Taylor, Jr., D. S. Schmidt, S. K. Martin, N. Marano, and C. P. Quinn – Mass Value Assignment of Total and Subclass Immunoglobulin G in a Human Standard Anthrax Reference Serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Sep 2004; 11: 919 – 923.

З питань якості Набору «**Загальний IgG-ІФА**» звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23
 тел./факс: + 38 (044) 422-62-16
 email: info@xema.com.ua
 www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА»
 Коваленко Еліна Володимирівна

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК