

Утверждена
приказом Росздравнадзора
от « ____ » _____ 20 ____ г.
№ _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для полуколичественного
иммуноферментного определения IgG-аутоантител
к коллагену человека IV типа в сыворотке крови
«IgG-Ауто-коллаген-IV-ИФА»

1. Назначение

1.1. Набор реагентов «IgG-Ауто-коллаген-IV-ИФА» предназначен для полуколичественного определения содержания IgG-аутоантител к коллагену человека IV типа в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение IgG-АТ используется в алгоритме комплексной диагностики и мониторинга лечения хронических заболеваний печени и почек, а также для оценки степени активности аутоиммунного процесса и дальнейшей коррекции специфической терапии. Этот диагностический тест может быть использован в практике работы врачей нефрологов, гастроэнтерологов, клинических иммунологов.

1.3. Набор рассчитан на определение содержания IgG-АТ коллагена IV типа в дублях 40 анализируемых образцов сыворотки крови и в 5 образцах калибровочных проб.

2. Принцип метода.

2.1. Принцип метода – твердофазный неконкурентный непрямой иммуноферментный анализ. В наборе использованы 2 вида моноклональных анти-IgG-антител, одни из которых используются для покрытия референс-стрипов, а вторые входят в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса иммуноглобулина G, которые аффинно взаимодей-

ствуют с коллагеном IV типа, сорбированным на поверхности полистиролового планшета.

Активность пероксидазы определяют по разложению субстрата - перекиси водорода. Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (ТМБ – тетраметилбензидина) в окрашенное соединение, количество которого пропорционально содержанию коллагена в сыворотке крови.

Результаты анализа регистрируют с помощью фотометра вертикального сканирования при длине волны 450 нм.

3. Состав набора.

3.1. В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет полистироловый 96-луночный наборный (два 8-луночных стрипа, покрытых моноклональными анти-IgG-АТ [МКАТ-анти-IgG] – референс-стрипы, маркированы P₁ и десять 8-луночных стрипов, покрытых антигеном коллагена IV типа, маркированы P₂ – 1 шт;

- калибровочные пробы (КП) на основе эмбриональной телячьей сыворотки с использованием препарата IgG человека и мертиолята натрия 0,1%, содержащие известные количества IgG в 10-кратной концентрации: 50, 20, 10, 2, 0 мкг/мл; калибровочные пробы аттестованы по Второму международному стандарту IgG человека IRP 75/502, маркированы P₃, готовы к применению – 5 флаконов (по 0,05 мл);

- конъюгат МКАТ анти-IgG с пероксидазой хрена, 100-кратный концентрат, маркирован P₄ - 1 флакон (0,25 мл);

- промывающий раствор, 10-кратный концентрат [трис (оксиметил) аминотан], 3,6; 1 М раствор соляной кислоты; натрия хлорид, 5,1 г; твин-20, 0,3 мл], рН 7,4, маркирован P₅ - 1 флакон (30 мл);

- тетраметилбензидин (ТМБ), маркирован P₆, готовый к применению - 1 флакон (22 мл);

- стоп-реагент (1N раствор серной кислоты), маркирован P₇, готовый к применению - 1 флакон (12 мл);

- трафарет для анализа - 1 шт.;

- инструкция по применению.

4. Аналитические характеристики набора

4.1. Чувствительность набора (минимально определяемая концентрация) составляет не менее 0,2 мкг/мл, что соответствует 1 классу RAST.

5. Анализируемые образцы

5.1. Негемолизированная прозрачная сыворотка крови человека.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 дней или при температуре -20 °С и ниже не более 3 месяцев. Перед проведением анализа образцы анализируемых сывороток развести в 10 раз промывающим раствором.

Повторное замораживание образцов не допускается.

6. Меры предосторожности

6.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

6.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях, за исключением стоп-реагента (1N раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием; следует избегать его разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.)

6.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий производить измерение оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные и многоканальные варьирующие со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка $\pm 3\%$);
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер);
- термостат, поддерживающий температуру $37 \pm 1^\circ \text{C}$;
- холодильник бытовой;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- стакан мерный вместимостью 25 мл;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

8. Подготовка к анализу

8.1. Извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре ($18-25^\circ \text{C}$) в течение времени не менее 30 минут.

8.2. Приготовить рабочий промывающий раствор.

К одному объему промывающего раствора добавить 9 объемов дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Рабочий промывающий раствор можно хранить при температуре $2-8^\circ \text{C}$ не более 10 дней.

8.3. Приготовить рабочий раствор конъюгата.

В стакан мерный вместимостью 25 мл перенести 100 мкл из флакона P_4 , довести до метки 10 мл рабочим промывающим раствором (п. 8.2.) и перемешать. Готовить за 30 минут перед использованием!

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре $2-8^\circ \text{C}$ не более 2 дней.

8.4. Подготовить анализируемые пробы. Образцы анализируемых сывороток развести в 10 раз промывающим раствором (п. 5.1.).

8.5. Составить схему расположения исследуемых образцов на прилагаемом трафарете.

9. Проведение анализа

9.1. Анализы следует проводить в дублях.

9.2. Использовать только одноразовые наконечники для каждого образца.

9.3. Время внесения образцов в лунки планшета не должно превышать 10-12 минут. Время инкубации необходимо исчислять от момента внесения реагента в последнюю лунку.

9.4. Образцы вносят в соответствии со схемами их расположения на трафарете (схема 1).

Схема 1

Референс – система		Стрипы, сорбированные коллагеном IV типа образцы сывороток (ОС)										
A	КП _{50,0}	КП _{50,0}	1		9		17		25		33	Все анализируемые пробы вносятся в дублях по горизонтали 1 - 40 – номера анализируемых проб для определения коллагена IV типа
B	КП _{20,0}	КП _{20,0}	2		10		18		26		34	
C	КП _{10,0}	КП _{10,0}	3		11		19		27		35	
D	КП _{2,0}	КП _{2,0}	4		12		20		28		36	
E	КП ₀	КП ₀	5		13		21		29		37	
F			6		14		22		30		38	
G			7		15		23		31		39	
H			8		16		24		32		40	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

9.5. Во все лунки планшета внести по 90 мкл рабочего промывающего раствора (п. 8.2.).

9.6. Внести в лунки А-Е первого и второго рядов по 10 мкл калибровочных проб (КП) в 10-кратных концентрациях мкг/мл (КП₅₀, КП₂₀, КП₁₀, КП₂, КП₀), которые с учетом разведения в лунках планшета будут соответствовать концентрациям КП в 1-кратных (мкг/мл): КП₅, КП₂, КП₁, КП_{0,2}, КП₀. В лунки А-Н с 3-го по 12-ой ряды планшетов внести образцы сывороток по 10 мкл в дублях по горизонтали для определения коллагена IV типа.

9.7. Закрывать планшет крышкой и перемешать содержимое планшета на шейкере в течение 30 сек, после чего инкубировать при температуре 37 ± 1 °C в течение 1 часа.

9.8. После завершения инкубации удалить жидкость из лунок планшета, промыть планшет с помощью вошера с добавлением в каждую лунку по 200 мкл рабочего промывающего раствора с последующим удалением жидкости и осушением лунок.

Процедуру повторить еще два раза.

9.9. Внести во все лунки планшета по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 8.3.), инкубировать при температуре 37 °C в течение 1 часа, удалить жидкость из лунок и промыть лунки планшета так, как это указано в п. 9.8., после чего промыть лунки планшета дистиллированной водой два раза также при помощи вошера.

После окончания последней промывки удалить следы жидкости из лунок постукиванием в перевернутом состоянии по фильтровальной бумаге.

9.10. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ (P_6) и инкубировать планшет в темном месте при комнатной температуре (18-25 °C) в течение 3-15 минут в зависимости от степени развития голубого окрашивания.

9.11. Добавить во все лунки по 50 мкл стоп-реагента (P_7); при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

9.12. Измерить оптическую плотность (ОП) растворов в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм в течение времени не более 5 минут после остановки реакции по установленной в приборе программе измерения и расчета количественных тест-систем.

10. Учет результатов

10.1. Полученные и распечатанные прибором значения концентраций анализируемых проб, рассчитанных по калибровочной кривой, умножают на 10 (факторы разведения проб до анализа) и определяют концентрации IgG в мкг/мл.

Для удобства использования уровня концентраций IgG – АУТ в мкг/мл, эти концентрации модифицируются в систему классов (таблица 1).

Таблица 1

Калибровочные пробы (КП) Концентрация IgG (мкг/мл) Разведение в 10 раз	ОП 450 нм	Классы	Образцы сывороток (ОС) (разведение в 10 раз)
			В системе классов
КП _{5,0}	>2,0 1,5 – 2,0	4	очень высокий уровень
КП _{2,0}	0,9 – 1,5	3	высокий уровень
КП _{1,0}	0,5 – 0,8	2	средний уровень
КП _{0,2}	0,3 – 0,5	1	низкий уровень
КП _{<0,2}	0	0	0

11. Условия хранения

11.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия – производителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

11.2. Срок годности набора – 6 месяцев.

11.3. Вскрытые стрипы хранению не подлежат.

11.4. Калибровочные пробы после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8 °С не более 7 дней или при температуре -20 °С (и ниже) не более 2 месяцев.

11.5. Конъюгат (100-кратный концентрат) после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 1 месяца.

11.6. Концентрат промывающего раствора и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

11.7. ТМБ после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 месяцев.

11.8. Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 дней.

11.9. Рабочий промывающий раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 10 дней.

11.10. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

11.11. При проведении исследований следует учесть, что при использовании каждого планшета необходимо обязательно анализировать калибровочные пробы.

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

По вопросам, касающимся качества набора «IgG-Ауто-коллаген-IV-ИФА», следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс» по адресу: 355021, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177Г, стр. 1, тел/факс +7(8652)28-34-60.