

## ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для кількісного імуноферментного визначення загальних IgA, IgM, IgG  
(Ig AMG–БЕСТ)

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Ig AMG –БЕСТ» призначений для кількісного *in vitro* визначення загальних IgA, IgM, IgG у сироватці крові людини та інших біологічних рідинах людини методом твердофазного імуноферментного аналізу.

Набір «IgE–БЕСТ» рекомендований для проведення аналізу в дублікатах 40 невідомих, 6 калібрувальних проб, однієї проби контрольної сироватки й однієї проби для визначення оптичної густини розчину тетраметилбензидину (ТМБ) при використанні всіх стрипів одночасно. У випадку дробового застосування необхідна обов'язкова постановка всіх каліброваних проб для кожного окремого аналізу.

### 2. СКЛАД НАБОРУ

**Планшет** - розбірний полістирольний, з іммобілізованими антитілами до :

IgG - 4 стр. ( чорне маркування) ;

IgM - 4 стр. ( червоне маркування ) ;

IgA - 4 стр. ( зелене маркування) ;

**Кон'югат** – МКАТ до легких ланцюгів з пероксидазою хрому

**1 флакон**

**Калібрувальні проби** що містять відомі кількості IgG , IgM , IgA (концентрації IgG , IgM , IgA вказані на етикетках флаконів ) - 5 фл

**КС (контрольна сироватка)** містить відому кількість IgA, IgM, IgG

**1 флакон**

**ФСБ -Т** (×25 концентрат фосфатно -сольового буферного розчину)

**1 флакон**

**ТМБ (Розчин тетраметилбензидина)**

**1 флакон**

**Стоп-реагент**

**1 флакон**

*Додатково до складу набору можуть входити:* захисна плівка для мікропланшетів; пластикові ванночки для реактивів; одноразові наконечники; поліетиленовий пакет із замком для зберігання мікропланшета.

### 3. АНАЛІТИЧНІ Й ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ.

**3.1. Чутливість.** для IgG -0,2 мг / мл (2,5МО/мл) , IgM - 0,032 мг / мл (4,0МО/мл) , IgA - 0,021 мг / мл (1,5 МО/мл).

**3.2. Специфічність.** 100%

**3.3. Очікуванні значення.**

Концентрація IgG у дорослих 4,8 – 16,0 мг/мл (60 -200 МО/мл)  
у дітей 3,0 – 15,5 мг/мл (37 – 194 МО/мл)

Концентрація IgM у дорослих 0,5 – 2,0 мг/мл (60 -250 МО/мл)  
у дітей 0,5– 2,2 мг/мл (60 – 275 МО/мл)

Концентрація IgA у дорослих 0,8 – 4,0 мг/мл (57 -285 МО/мл)  
у дітей 0,3 – 2,8 мг/мл (20 – 200 МО/мл)

### 4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ.

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не пікетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

### 5. ОБЛАДНАННЯ Й МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ:

Одно- Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5- 3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

### 6. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

**6.1** . Перед проведенням аналізу витягти набір з холодильника , розкрити упаковку і витримати всі компоненти набору , в тому числі і запечатаний пакет з планшетом , і аналізовані зразки при температурі від 18 до 25°C не менше 30 хв.

**6.2** . Калібрувальні і контрольні зразки , кон'югат , розчин ТМБ і стоп- реагент готові до використання і не вимагають додаткового розведення. Перед проведенням аналізу флакони з калібрувальними і контрольним зразками струсити так , щоб краплі розчинів зі стінок і кришки опустилися на дно . Потім вміст флаконів ретельно перемішати піпетуванням , уникаючи утворення піни.

**6.3** . Приготування робочого промивального розчину

Робочий промивальний розчин готувати розведенням вихідного концентрату фосфатно -сольового буферного розчину з твіном в 25 разів. Для цього вміст флакона з концентратом ФСБ -Т розвести до 700 мл дистильованою водою. При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при 30-40°C до повного розчинення осаду. Робочий буферний розчин використовують для розведення сироваток та промивання планшетів. Зберігання : до 5 діб при 2-8°C.

### 7. Аналізовані зразки

**7.1** . Для аналізу використовують сироватку ( плазму ) крові або інші біологічні рідини людини. Термін зберігання зразків

- не більше 48 год при 2-8°C. При необхідності зразки можна тривалий час зберігати при мінус 20°C. Після розморожування ретельно перемішати, осад відокремити центрифугуванням. Теплова обробка зразків повинна бути виключена, оскільки вона може призвести до часткової денатурації імуноглобулінів. Для отримання порівнянних результатів слід використовувати зразки одного типу.

**7.2.** Підготовка робочого розведення аналізованих зразків проводиться безпосередньо перед початком проведення аналізу в окремих заздалегідь промаркованих флаконах.

В чистий флакон з 10 мл робочого промиваючого розчину (п. 6.3.) Додати 10 мкл аналізованої сироватки і ретельно перемішати. Таким чином, робоче розведення сироватки становить 1000 разів.

Також можна проводити двоступеневе розведення сироваток з використанням планшета для попереднього розведення аналізованих зразків. Для цього в кожну лунку планшета для попереднього розведення внести по 310 мкл робочого промиваючого розчину. Потім в одну з лунок, наприклад А-1, додати 10 мкл аналізованої сироватки і ретельно перемішати наконечником піпетки (5-6 кругових рухів, під час яких слід 3-4 рази набрати і спорожнити наконечник), уникаючи утворення піни. Після цього з лунки відібрати 10 мкл і внести до сусідньої лунки, наприклад А-2, і також ретельно перемішати. У лунці А-2 отримемо робоче розведення сироватки в 1000 разів. Аналогічно розвести так інші аналізовані сироватки (наприклад, в лунках В-1 і В-2, С-1 і С-2 і т.д.):

310 мкл робочого промиваючого розчину + 10 мкл аналізованого зразка

розведення І в 32 рази ;

310 мкл робочого промиваючого розчину + 10 мкл розчину з розведенням І

робоче розведення ІІ

**Увага!** Точність приготування розведень визначає якість постановки тесту!

**7.3.** Якщо концентрації відповідних імуноглобулінів в досліджуваному зразку перевищують максимальні значення калібрувальних зразків, зразок для повторного дослідження рекомендується додатково розвести в 2 рази.

**7.4.** При дослідженні не сироватки, а інших біологічних рідин, ступінь розведення досліджуваних зразків слід заздалегідь підбирати досвідченим шляхом, виходячи з середніх значень рівнів імуноглобулінів у відповідних біологічних рідинах (див. таблицю 1).

Таблиця 1

**Абсолютні значення рівнів вмісту імуноглобулінів у різних біологічних рідинах у здорових осіб.**

Біологічні рідини	Вміст імуноглобулінів класів				
	IqA, г/л	IqM, г/л	IqG, г/л	sIqA, г/л	IqE, кЕ/л
СМР	0,006±0,0013	0,0049±0,001	0,037±0,004	н/вияв.	0±0
Слина	0,069±0,028	0,055±0,011	0,042±0,017	0,768±0,275	н/вияв.
Назальний змив	0,014±0,006	0,025±0,017	0,042±0,017	0,071±0,022	0±0
Ларингеальний секрет	0,071±0,022	0,063±0,044	0,085±0,044	1,31±1,87	н/вияв.
Слізна рідина	0,165±0,02	0,038±0,008	0,185±0,06	н/вияв.	н/вияв.
Еякулят	1,01±0,67	0,9±0,46	0,51±0,2	2,21±1,01	0±0
Сиворотка крові	2,15±0,85	1,63±0,46	12,3±2,97	0,79±0,22	50,0 ±12,5

**Примітка:** н/вияв. - даний показник не виявляли

## 8. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Перед початком роботи з набором необхідно уважно прочитати «Інструкцію по застосуванню набору». У разі неточного виконання інструкції не гарантується достовірність отримуваних результатів.

Заборається при роботі з набором використовувати один і той же наконечник (наконечники) для вмісту різних флаконів і різних аналізованих зразків. При розведенні і перемішуванні компонентів і досліджуваних зразків не допускати утворення піни. При проведенні кожної серії аналізів обов'язкове постановка калібрувальних зразків.

Для підвищення достовірності результатів калібрувальні та досліджувані зразки рекомендується аналізувати в дублях, використовуючи для кожного зразка по дві лунки.

**8.1.** У всі лунки стрипів внести по 100 мкл робочого промивного розчину (п. 6.3.).

**8.2.** У верхні лунки А-1, А-2, А-5, А-6, А-9, А-10 внести по 20 мкл калібрувального зразка КЗ І. Далі внести у відповідні лунки по 20 мкл калібрувальних зразків (КЗ ІІ, КЗ ІІІ, КЗ ІV, КЗ V) і контрольної сироватки згідно зі схемою постановки аналізу (див. таблицю 2). В інші лунки внести по 20 мкл розведених аналізованих зразків сироваток крові, щоразу змінюючи наконечник.

**Схема постановки аналізу**

**Таблиця 2.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	КЗ І	КЗ І	A33	A33	КЗ І	КЗ І	A33	A33	КЗ І	КЗ І	A33	A33
B	КЗ ІІ	КЗ ІІ	A34	A34	КЗ ІІ	КЗ ІІ	A34	A34	КЗ ІІ	КЗ ІІ	A34	A34
C	КЗ ІІІ	КЗ ІІІ	A35	A35	КЗ ІІІ	КЗ ІІІ	A35	A35	КЗ ІІІ	КЗ ІІІ	A35	A35
D	КЗ ІV	КЗ ІV	A36	A36	КЗ ІV	КЗ ІV	A36	A36	КЗ ІV	КЗ ІV	A36	A36
E	КЗ V	КЗ V	A37	A37	КЗ V	КЗ V	A37	A37	КЗ V	КЗ V	A37	A37
F	КС	КС	A38	A38	КС	КС	A38	A38	КС	КС	A38	A38

G	A31	A31	A39	A39	A31	A31	A39	A39	A31	A31	A39	A39
H	A32	A32	A310	A310	A32	A32	A310	A310	A32	A32	A310	A310
	IgG (чорний колір)				IgM (червоний колір)				IgA (зелений колір)			

КЗ I , КЗ II , КЗ III , КЗ IV , КЗ V - калібрувальні зразки

КС. – Контрольна сироватка

A3 - аналізований зразок

Внесення зразків необхідно проводити швидко, протягом 10 хвилин.

Стрипи закрити липкою плівкою та інкубувати 20 хв у термо- шейкері з частотою 700 об / хв при 37°C.

**8.3 .** По закінченні інкубації зняти липку плівку і помістити в посудину з дезинфікуючим розчином. За допомогою промивного пристрою або багатоканальної піпетки промити лунки планшета 5 разів робочим промиваючим розчином , чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипа . У кожен лунку вносити не менше 350 мкл рідини в процесі кожного циклу промивки. Час між заповненням та випороженням лунок має бути не менше 30 сек . *Необхідно домагатися повного спорознення лунок після кожного їх заповнення.* По закінченні промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити , постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному паперу .

**8.4 .** У кожен лунку внести по 100 мкл кон'югату , стрипи закрити липкою плівкою і інкубувати протягом 20 хв у термо- шейкері з частотою 700 об/хв при 37°C. Після інкубації стрипи промити , як описано в п. 8.3 .

*Для внесення кон'югату використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники , що входять до складу набору .*

**8.5 .** У всі лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ плюс. Стрипи закрити липкою плівкою і інкубувати у темряві протягом 15 хвилин при 18-25°C.

*Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники , що входять до складу набору .*

**8.6 .** У всі лунки стрипів додати по 100 мкл стоп- реагенту .

## 9 . РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати аналізу реєструвати за допомогою спектрофотометра , вимірюючи оптичну

густину у двоххвильовому режимі: основний фільтр - 450 нм , референс - фільтр - в діапазоні 620-655 нм. Допускається реєстрація результатів тільки з фільтром 450 нм.

Вимірювання проводити через 2-3 хв після зупинки реакції . Час між зупинкою реакції і вимірюванням оптичної густини не повинно перевищувати 10 хв.

## 10 . КОРОТКА СХЕМА ІФА

*Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією !*

**Внести :** по 100 мкл робочого промиваючого розчину ;

по 20 мкл калібрувальних зразків і контрольної сироватки в лунки в дублях ;

по 20 мкл розведених аналізованих зразків в лунки для аналізу в дублях .

**Інкубувати :** 20 хв , 37°C , 700 об/хв .

**Промити :** робочим промиваючим розчином , 350 мкл , 5 разів.

**Внести :** по 100 мкл кон'югату .

**Інкубувати :** 20 хв , 37°C , 700 об/хв .

**Промити :** робочим промиваючим розчином , 350 мкл , 5 разів.

**Внести :** по 100 мкл розчину ТМБ .

**Інкубувати :** 15 хв , 18-25°C , в темряві.

**Внести :** по 100 мкл стоп- реагенту .

**Виміряти :** ОГ при 450 нм / референсная довжина хвилі 620-655 нм.

## 11 . ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

**11.1 .** За результатами вимірювання обчислити середні арифметичні значення оптичної густини ( ОГ ) у лунках з аналізованими зразками .

Результати досліджень враховують тільки в тому випадку , якщо :

- Середнє значення ОГ калібрувального зразка I ( ОГ КЗ I ) не більше 0,2 о.е. ;

- Середнє значення ОГ калібрувального зразка V ( ОГ КЗ V ) не менше 0,9 о.е.

**11.2 .** Побудувати калібрувальні графіки залежності оптичної густини ( вісь ординат ) від концентрацій відповідних імуноглобулінів ( вісь абсцис ) у калібрувальних зразках . Для цього на прикладеному трафареті для побудови відповідного графіка проти концентрації кожного калібрувального зразка відкласти відповідне їй середнє значення оптичної густини. Послідоно з'єднати отримані точки відрізками прямих ліній.

**11.3 .** Визначити концентрацію відповідного імуноглобуліну в контрольному зразку і в аналізованих зразках за калібрувальним графіком. Для цього на осі ординат відзначити значення ОГ аналізованого зразка. Провести пряму лінію паралельно осі абсцис до перетину з калібрувальним графіком . Від точки перетину опустити перпендикуляр на вісь абсцис . За отриманою точці перетину визначити значення концентрації імуноглобуліну у зразку.

**11.4 .** Якщо при проведенні аналізу використовували рекомендований для сироватки розведення в 1000 разів , то знайдене за графіком значення концентрації імуноглобуліну відповідає концентрації в аналізованому зразку в мг / мл. Якщо використовували інше розведення зразка , то знайдене за графіком значення концентрації імуноглобуліну перераховують з урахуванням додаткового розведення , також отримуючи в результаті його концентрацію в мг / мл.

Для представлення результатів вимірювання концентрації імуноглобулінів у МО / мл необхідно застосовувати відповідні коефіцієнти перерахунку :

для IgG : 12,5 ( 1 мг / мл IgG = 12,5 МО / мл IgG ) ;  
 для IgM : 125 ( 1 мг / мл IgM = 125 МО / мл IgM ) ;  
 для IgA : 71,4 ( 1 мг / мл IgA = 71,4 МО / мл IgA ) .

**11.5** . Якщо значення оптичної густини зразка перевищує значення ОГ КЗ V , то даний зразок аналізують повторно після додаткового розведення ( див. п. 7.3 . ) , Отриманий результат множать на 2.

**11.6** . Побудовані калібрувальні графіки придатні для визначення концентрації імуноглобулінів тільки в тих зразках , аналіз яких проводили одночасно з калібрувальними зразками .

**11.7** . Контрольна сироватка служить для перевірки достовірності результатів аналізу . Виміряні значення концентрацій IgG , IgM і IgA в контрольному зразку не повинні виходити за межі інтервалів , зазначених на етикетці флакона. У цьому випадку результати аналізу можна вважати достовірними.

#### Імунограма при деяких захворюваннях

	IgG	IgA	IgM	IgE
<b>Захворювання печінки</b>				
Гострий інфекційний гепатит	+	N/+	N/++	N
Хронічний персистуючий гепатит	N/+	N	N/+	N/+
Хронічний агресивний гепатит	++	+	N/++	N/+
Постгепатитний криптогенний цироз	++	+	+	N/+
Первинний біліарний цироз	N/+	N	+ /++	N
Алкогольний цироз	N/+	++	N/+	N
<b>Хвороба нирок</b>				
Гострий пієлонефрит	N	N	+ /++	N
Хронічний пієлонефрит	+ /++	N	+ /++	N/+
Нефротичний синдром	-	-	N/-	N/-
<b>Інфекційні захворювання</b>				
Гостра інфекція	N	N	+ /++	N
Хронічна інфекція	+ /++	N/+	N/+	N/+
<b>Системні ревматичні захворювання</b>				
Ревматоїдний артрит	N/++	N/++	N/+	+ /++
Системна червона вовчанка	+	N	N/+	N/+
Склеродермія	N	N	N	N/+
Змішана система захворювання	N/+	N/+	N	N/+
Атопія, алергічні захворювання	N/+	N	N/-	+ /++
Гельмінтози та інші паразит.захв.	N/+	N/+	N/+	+ /++

**N** – норма; **+** - підвищена концентрація; **++** - сильно підвищена концентрація; **-** - знижена концентрація;

## 12 . УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

Набір Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 5 діб. Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися: в **ТОВ «Бест Діагностик»** за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9, тел./факс: (044) 500-57-11 E-mail: [info@bestdiagnostic.com.ua](mailto:info@bestdiagnostic.com.ua)

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.