**«УТВЕРЖДАЮ»**
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д.Хусаинов
«13» _____ 2022 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса М
в сыворотке крови
**(IgM общий-ИФА-БЕСТ)**

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса М в сыворотке крови «IgM общий-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации общего иммуноглобулина класса М ($IgM_{общ}$) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных и 1 контрольного образцов (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета).

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип метода

Метод определения основан на двухстадийном «сэндвич» – варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к IgM.

На первой стадии калибровочные образцы с известной концентрацией $IgM_{общ}$ и анализируемые образцы инкубируются в лунках стрипированного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами (МКАТ) к мю-цепям IgM. На второй стадии связавшийся в лунках IgM обрабатывают конъюгатом МКАТ к легким (лямбда и каппа) цепям иммуноглобулинов человека с пероксидазой.

Образовавшиеся иммунные комплексы «иммобилизованные МКАТ – IgM – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией с раствором тетраметилбензидина. Степень окрашивания пропорциональна концентрации $IgM_{общ}$ в анализируемом образце. После измерения величины оптической плотности раствора
в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация $IgM_{общ}$ в анализируемых образцах.

### 2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к мю-цепям IgM человека, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества $IgM_{общ}$ – 0, 20, 40, 100, 200 и 400 Ед/мл (0; 0,16; 0,32; 0,8; 1,6 и 3,2 мг/мл), аттестованные относительно WHO International Standard Immunoglobulins G, A and M, human serum, NIBSC 67/086; концентрации $IgM_{общ}$ в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовые для использования – 6 флаконов (по 0,5 мл);
- контрольный образец на основе инактивированной сыворотки крови человека с известным содержанием $IgM_{общ}$, аттестованный относительно WHO International Standard Immunoglobulins G, A and M, human serum, NIBSC 67/086; готовый для использования – 1 флакон (0,5 мл);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– конъюгат моноклональных антител к легким цепям (лямбда и каппа) иммуноглобулинов человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
– раствор для разведения сывороток (РРС), концентрат – 1 флакон (28 мл);
– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28 мл);
– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 флакон (13 мл);
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
– пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
– ванночка для реагента – 2 шт.;
– наконечники для пипетки на 5–200 мкл – 16 шт.

Принадлежности:
– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1.** Специфичность. В наборе «IgM общий-ИФА-БЕСТ» используются моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью к мю-цепям IgM. Перекрестного связывания с IgG, IgA, IgE или альбумином в физиологических концентрациях не наблюдалось.

**3.2.** «Хук-эффект» при использовании набора реагентов не зафиксирован. Оптическая плотность образцов сыворотки крови с концентрацией $IgM_{общ}$ до 1000 Ед/мл всегда превышала оптическую плотность калибровочного образца с максимальной концентрацией $IgM_{общ}$.

**3.3.*** Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения концентрации $IgM_{общ}$ в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

**3.4.*** Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации $IgM_{общ}$ при разведении калибровочных образцов, содержащих 400, 200, 100 и 40 Ед/мл, в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

**3.5.*** Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации $IgM_{общ}$ расчетному значению в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца с концентрацией $IgM_{общ}$ 40 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

**3.6.*** Чувствительность. Минимально определяемая концентрация $IgM_{общ}$, рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца $B_0$ (с концентрацией $IgM_{общ}$ 0 Ед/мл) плюс 2σ (σ-среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения $B_0$), не превышает 4 Ед/мл (0,032 мг/мл).

**3.7.** Клиническая проверка. Концентрация $IgM_{общ}$, измеренная в сыворотке крови условно здоровых доноров находилась в диапазоне 60÷270 Ед/мл (см. также стр. 28).

**3.8.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации $IgM_{общ}$, соответствующие нормальным для данного региона, у обследуемого контингента людей.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**4.1.** Потенциальный риск применения набора – класс 2а (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

**4.2.** Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**4.3.** При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г и в методических указаниях МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998.

**4.4.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицирован-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

**4.5.** Лабораторная посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

**4.6.** Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

**4.7.** Для дезинфекции посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор ($H_2O_2$, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

**4.8.** 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» Дезинфекцию наборов реагентов следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37±1°С и 400–800 об/мин;
- микроцентрифуга, позволяющая центрифугировать при 1500–2000 об/мин;
- промывочное устройство для планшетов;
- холодильник бытовой;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкостей от 5 до 350 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- дезинфицирующий раствор.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

**6.1.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

**6.2.** Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 48 часов или при температуре минус 20°С (и ниже) не более 3 мес. Повторное замораживание
и размораживание образцов сыворотки крови не допускается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

**6.3.** Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25°С.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

### 7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать в течение 1 часа после установки. Оставшиеся стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок.

*Хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

### 7.3. Приготовление промывочного раствора

Раствор готовится из концентрата фосфатно-солевого буферного раствора. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Приготовленный промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.*

### 7.4. Приготовление рабочего раствора для разведения сывороток.

*Приготовить за 30 мин до начала постановки анализа.*

При выпадении осадка солей в концентрате РРС необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата раствора для разведения сывороток и добавить соответствующее количество дистиллированной воды.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Приготовленный рабочий раствор для разведения сывороток можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 3 сут.*

### 7.5. Подготовка калибровочных образцов и контрольного образца.

Калибровочные образцы и контрольный образец готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения. Перед использованием флаконы встряхнуть или центрифугировать на микроцентрифуге так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое флаконов тщательно перемешать на вортексе или пипетированием, избегая образования пены.

*Калибровочные образцы и контрольный образец после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

### 7.6. Приготовление рабочего разведения анализируемых образцов сыворотки крови.

*Готовятся в стеклянных заранее промаркированных флаконах за 5–10 мин до начала постановки анализа.*

В чистый флакон с 10 мл рабочего раствора для разведения сывороток (см п. 7.4) добавить 10 мкл исследуемой сыворотки и тщательно перемешать. Таким образом, рабочее разведение сыворотки составит 1000 раз*.

*Использовать в течение 30 мин после приготовления.*

### 7.7. Подготовка конъюгата.

*Конъюгат готов к использованию.*

Необходимое количество конъюгата отобрать в чистый флакон или ванночку для реагента.

*Оставшийся после проведения ИФА конъюгат утилизировать* ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом).***

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Конъюгат после вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

### 7.8. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс.

*Раствор ТМБ плюс готов к использованию.*

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Необходимое количество раствора ТМБ плюс отобрать в чистый флакон или ванночку для реагента.

*Оставшийся после проведения ИФА раствор ТМБ плюс утилизировать* ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).***

Необходимо исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс.

В таблице приведен расход реагента в зависимости от количества используемых стрипов.

*Раствор ТМБ плюс после вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

**7.9.** Стоп-реагент готов к использованию.

*После вскрытия можно хранить в плотно закрытом флаконе при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.*

## ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

**7.10.** Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора для разведения сывороток (см п. 7.4).

Внести в соответствующие лунки в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов, по 20 мкл каждого калибровочного образца. В следующую пару лунок внести по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови в рабочем разведении (см п. 7.6.), каждый раз меняя наконечник.

*Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.*

**7.11.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин при встряхивании на термостатируемом шейкере при температуре 37±1°С и 700 об/мин.

**7.12.** По окончании инкубации снять пленку и удалить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить отсасыванием
в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного раствора (см п. 7.3.). Процесс промывки повторить еще 4 раза. Общее количество отмывок равно 5. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. Затем удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**7.13.** Внести во все лунки планшета по 100 мкл конъюгата (см п. 7.7.).

*Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**7.14.** Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 20 мин при встряхивании на термостатируемом шейкере при температуре 37±1°С и 700 об/мин.

**7.15.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет, как это указано в п. 7.12.

**7.16.** Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина плюс (см п. 7.8.) и инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25°С.

*Для внесения раствора тетраметилбензидина плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

**7.17.** Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина плюс, по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только с фильтром 450 нм. Измерение проводить через 2–3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

**9.1.** Вычислить средние арифметические значения оптической плотности для каждой пары лунок, содержащих калибровочные образцы.

**9.2.** Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации $IgM_{общ}$ в калибровочных образцах (Ед/мл или мг/мл).

**9.3.** Определить концентрацию $IgM_{общ}$ в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Вычислить среднее арифметическое значение концентрации для каждой пары лунок, содержащих анализируемые образцы.

**9.4.** Если при проведении анализа использовали разведение сыворотки в 1000 раз (базовое разведение для данного набора), то найденное по графику количество $IgM_{общ}$ соответствует концентрации $IgM_{общ}$ в анализируемом образце в Ед/мл (мг/мл). Если использовали другое разведение образца, то найденное по графику количество $IgM_{общ}$ пересчитывают с учетом дополнительного разведения, также получая в результате концентрацию $IgM_{общ}$ в Ед/мл (мг/мл).

Если значение оптической плотности анализируемого образца превышает значение ОП для калибровочного образца 400 Ед/мл (3,2 мг/мл), то данный образец анализируют повторно после дополнительного разведения в 2 раза, полученный результат умножают на 2.

## 10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

**10.1.** Транспортировать изделия следует 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 10 суток.

**10.2.** Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

**10.3.** Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

**10.4.** Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности. В случае дробного использования набора:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности;
- калибровочные образцы, контрольный образец и конъюгат после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, концентрат раствора для разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
- рабочий раствор для разведения сывороток можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 3 сут;
- промывочный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8°С не более 5 сут.

**10.5.** Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, рекомендуется также каждый раз определять концентрацию $IgM_{общ}$ в контрольном образце.

**10.6.** Для перевода результатов измерений концентрации иммуноглобулина М из Ед/мл в мг/мл следует использовать коэффициент пересчета 0,008 (1 Ед/мл IgM = 0,008 мг/мл IgM).

**10.7.** При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

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

## 11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

**11.1.** Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

**11.2.** Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

**11.3.** Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

**По вопросам, касающимся качества набора «IgM общий -ИФА-БЕСТ»,**
следует обращаться в АО «Вектор-БЕСТ» по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 363-20-60, 227-75-43,
тел./факс (383) 363-35-55.
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ.

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации $IgM_{общ}$ в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

### 1. Обеспечение получения правильных результатов анализа

**Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:**

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут влиять ферментативную активность конъюгатов;

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования обрабатывайте 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с ТМБ;

– если допущена ошибка при внесении в лунку анализируемого образца, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

**Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:**

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки используйте автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

## 2. Рекомендации по подготовке анализируемых образцов

Вместо одноступенчатого (п. 7.6.) допустимо проводить двухступенчатое разведение сывороток с использованием планшета для предварительного разведения исследуемых образцов. Для этого, в каждую лунку планшета для предварительного разведения внести по 310 мкл рабочего раствора для разведения сывороток. Далее в одну из лунок, например, А-1, добавить 10 мкл исследуемой сыворотки, сменить использованный наконечник пипетки на новый и затем с его помощью тщательно перемешать содержимое лунки (5–6 круговых движений, во время которых следует 3–4 раза набрать и опорожнить наконечник), избегая образования пены. После этого из лунки отобрать 10 мкл, внести в соседнюю лунку, например, А-2, и таким же образом тщательно перемешать (для этой операции также желательно использовать новый чистый наконечник пипетки). В лунке А-2 получаем рабочее разведение сыворотки 1000 раз. Аналогично развести и другие исследуемые сыворотки (например, в лунках В-1 и В-2, С-1 и т.д.):

– 310 мкл рабочего раствора для разведения сывороток + 10 мкл исследуемого образца → предварительное разведение образца в 32 раза;

– 310 мкл рабочего раствора для разведения сывороток + 10 мкл образца после предварительного разведения → рабочее разведение образца в 1000 раз.

**Внимание!** *Точность приготовления разведений определяет качество постановки теста!*

При исследовании не сыворотки, а других биологических жидкостей, степень разведения исследуемых образцов следует заранее подобрать опытным путем, используя как ориентир данные таблицы 2.

## 3. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов:

$ОП_0 < ОП_{20} < ОП_{40} < ОП_{100} < ОП_{200} < ОП_{400}$;

– $ОП_{400} \geq 1{,}0$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– вычисленное по калибровочному графику значение концентрации $IgM_{общ}$ в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

$ОП_0$, $ОП_{20}$, $ОП_{40}$, $ОП_{100}$, $ОП_{200}$ и $ОП_{400}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0; 20; 40; 100; 200 и 400 мг/мл соответственно.

## 4. Расчет результатов анализа

По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации $IgM_{общ}$ (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить содержание $IgM_{общ}$ в контрольном и в анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию параллельно оси абсцисс до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации $IgM_{общ}$ в образце.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

## 5. Диагностическая значимость

IgM, как и другие иммуноглобулины, относится к гуморальным факторам иммунитета. Карта гуморального иммунитета довольно индивидуальна, тем не менее, пределы нормальных физиологических концентраций достаточно хорошо очерчены.

По нашим данным, концентрация $IgM_{общ}$ в сыворотке крови клинически здоровых доноров (Новосибирская область, Алтайский край) в возрасте от 20 до 50 лет находится в пределах диапазона 60–250 Ед/мл (0,48–2,0 мг/мл). У детей того же региона в возрасте 1–15 лет концентрация $IgM_{общ}$ составила 60–270 Ед/мл (0,48–2,16 мг/мл). Эти значения в целом близки нормальным значениям концентрации IgM (0,5–2,0 мг/мл), приводимым в работе Тотолян А.А., Марфичева Н.А., Тотолян Н.А. «Иммуноглобулины в клинической лабораторной диагностике», С-Пб, 1999. Однако их можно использовать только как ориентировочные, поскольку диапазоны нормальных концентраций IgM могут довольно существенно отличаться в зависимости от региона, возраста и некоторых др. причин. Известно также, что для использования в диагностике важнее знать не абсолютное значение концентрации общего иммуноглобулина, а его относительное отклонение от нормального местного, возрастного или, например, профессионального уровня. **В идеале, нормальные региональные уровни и по взрослым и по детям должны определяться каждой лабораторией самостоятельно!**

Уровень концентрации общего IgM в сыворотке крови новорожденных составляет около 10% от уровня взрослых. Через 1–3 месяца он увеличивается до 60-65%, а еще через 1–2 года нередко уже достигает уровня взрослого человека. Однако в этом возрасте возможны его значительные колебания. У подавляющего же большинства здоровых детей уровень концентрации общего IgM стабилизируется и становится равным уровню взрослых в возрасте 6–8 лет.

Результаты определения концентрации общего сывороточного IgM могут быть с успехом использованы для дифференциальной диагностики целого ряда заболеваний (см. иммунограмму).

Более полную картину способно дать параллельное определение всех трех основных классов иммуноглобулинов – G, M и A, а также иммуноглобулина E.

## 6. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «IgM общий – ИФА – БЕСТ»

*Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!*

**Внести:** по 100 мкл рабочего раствора для разведения сывороток;
по 20 мкл калибровочных и контрольного образцов в дублях в контрольные лунки;
по 20 мкл разведенных анализируемых образцов в дублях в лунки для исследуемых образцов.

**Инкубировать:** 20 мин, 37°С, 700 об/мин.

**Промыть:** промывочный раствор, 350 мкл, 5 раз.

**Внести:** по 100 мкл конъюгата.

**Инкубировать:** 20 мин, 37°С, 700 об/мин.

**Промыть:** промывочный раствор, 350 мкл, 5 раз.

**Внести:** по 100 мкл раствора ТМБ плюс.

**Инкубировать:** 15 мин, 18–25°С, в темноте.

**Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.

**Измерить:** ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

## 7. Графические символы

| | | | |
|---|---|---|---|
| REF | Номер по каталогу | IVD | Медицинское изделие для диагностики *in vitro* |
| Σ n | Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов | NON STERILE | Не стерильно |
| LOT | Код партии | | Температурный диапазон |
| | Изготовитель | | Дата изготовления |
| | Использовать до ... | | Обратитесь к инструкции по применению |
| | Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению | YYYY-MM-DD YYYY-MM | Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц |

**Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.:** (383) 363-05-97.

Таблица 1

| Кол-во используемых стрипов | Промывочный | | Рабочий раствор для разве- | | Конъюгат, мл | Раствор ТМБ плюс, мл |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ФСБ-Т×25, концентрат, мл | Дистил. вода, мл | РРС, концентрат, мл | Дистил. вода, мл | | |
| 2 | 4,0 | до 100 | 4,0 | до 100 | 2,0 | 2,0 |
| 3 | 6,0 | до 150 | 6,0 | до 150 | 3,0 | 3,0 |
| 4 | 8,0 | до 200 | 8,0 | до 200 | 4,0 | 4,0 |
| 5 | 10,0 | до 250 | 10,0 | до 250 | 5,0 | 5,0 |
| 6 | 12,0 | до 300 | 12,0 | до 300 | 6,0 | 6,0 |
| 7 | 14,0 | до 350 | 14,0 | до 350 | 7,0 | 7,0 |
| 8 | 16,0 | до 400 | 16,0 | до 400 | 8,0 | 8,0 |
| 9 | 18,0 | до 450 | 18,0 | до 450 | 9,0 | 9,0 |
| 10 | 20,0 | до 500 | 20,0 | до 500 | 10,0 | 10,0 |
| 11 | 22,0 | до 550 | 22,0 | до 550 | 11,0 | 11,0 |
| 12 | 24,0 | до 600 | 24,0 | до 600 | 12,0 | 12,0 |

Таблица 2

**Абсолютные значения уровней содержания иммуноглобулинов в различных биологических жидкостях у здоровых лиц (M±δ)**

*(Тотолян А.А. Современные подходы к диагностике иммунопатологических состояний. Мед. иммунология, 1999 ,т.1 №1-2, с. 75-108)*

| **Биологические жидкости** | **Содержание иммуноглобулинов классов:** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ***IgA*, г/л** | ***IgM*, г/л** | ***IgG*, г/л** | ***sIgA*, г/л** | ***IgE*, кЕ/л** |
| ЦСЖ | 0,006±0,0013 | 0,0049±0,001 | 0,037±0,004 | н/опр | 0±0 |
| Слюна | 0,069±0,028 | 0,055±0,011 | 0,042±0,017 | 0,768±0,275 | н/опр |
| Назальный смыв | 0,014±0,006 | 0,025±0,017 | 0,042±0,017 | 0,071±0,022 | 0±0 |
| Ларингеальный секрет | 0,071±0,022 | 0,063±0,044 | 0,085±0,044 | 1,31±1,87 | н/опр |

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Слезная жидкость | 0,165±0,02 | 0,038±0,008 | 0,185±0,06 | н/опр | н/опр |
| Эякулят | 1,01±0,67 | 0,9±0,46 | 0,51±0,2 | 2,21±1,01 | 0±0 |
| Сыворотка крови | 2,15±0,85 | 1,63±0,46 | 12,3±2,97 | 0,79±0,22 | 50,0±12,5 |

***Примечание:*** н/опр – данный показатель не определяли.

Приведенные показатели можно использовать только как ориентировочные, и в каждой лаборатории рекомендуется вычислить собственные границы нормальных значений концентрации общего IgM в сыворотке крови.

**Иммунограмма при некоторых заболеваниях**

| | IgG | IgA | IgM | IgE |
|---|---|---|---|---|
| **Заболевания печени** | | | | |
| Острый инфекционный гепатит | + | N/+ | N/++ | N |
| Хронический персистирующий гепатит | N/+ | N | N/+ | N/+ |
| Хронический агрессивный гепатит | ++ | + | N/++ | N/+ |
| Постгепатитный криптогенный цирроз | ++ | + | + | N/+ |
| Первичный билиарный цирроз | N/+ | N | +/++ | N |
| Алкогольный цирроз | N/+ | ++ | N/+ | N |
| **Болезни почек** | | | | |
| Острый пиелонефрит | N | N | +/++ | N |
| Хронический пиелонефрит | +/++ | N | +/++ | N/+ |
| Нефротический синдром | — | — | N/— | N/— |
| **Инфекционные заболевания** | | | | |
| Острая инфекция | N | N | +/++ | N |
| Хроническая инфекция | +/++ | N/+ | N/+ | N/+ |
| **Системные ревматические заболевания** | | | | |
| Ревматоидный артрит | N/++ | N/++ | N/+ | +/++ |
| Системная красная волчанка | + | N | N/+ | N/+ |
| Склеродермия | N | N | N | N/+ |
| Смешанные системные заболевания | N/+ | N/+ | N | N/+ |
| Атопия, аллергические заболевания | N/+ | N | N/— | +/++ |
| **Гельминтозы и др. паразитарные заболевания** | N/+ | N/+ | N/+ | +/++ |

N – нормальная регионально-возрастная концентрация иммуноглобулина (в пределах нормального диапазона от Nmin до Nmax)

\+ – повышенная концентрация иммуноглобулина (от Nmax до 1,3Nmax)

++– сильно повышенная концентрация иммуноглобулина (более 1,3Nmax)

– – пониженная концентрация иммуноглобулина (ниже Nmin)

* См. также раздел «Дополнительная информация для потребителей», п. 2

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

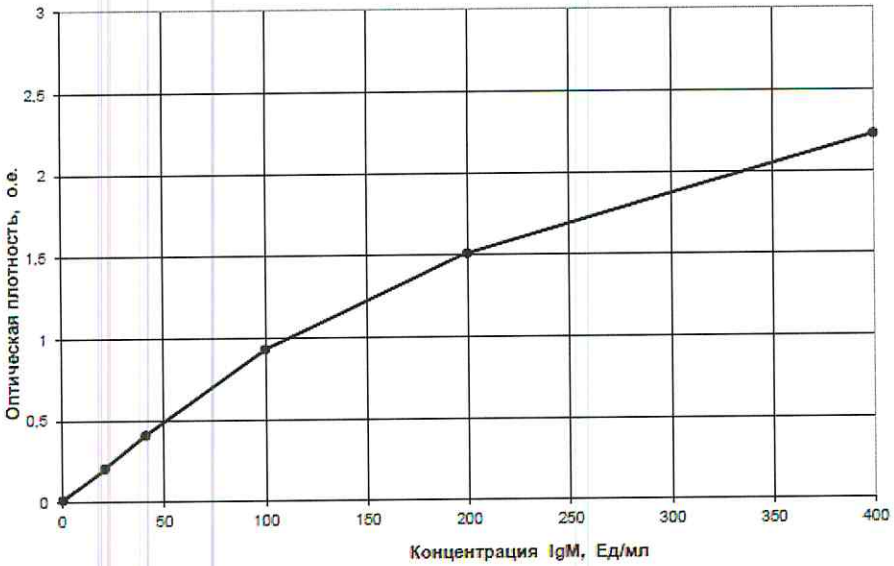



Рисунок. Зависимость оптической плотности от концентрации $IgM_{общ}$ в калибровочных образцах.

* по ГОСТ Р 51352-2013.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru