

ВЕКТОР



Набор реагентов
для иммуноферментного определения
концентрации пепсиногена 2
в сыворотке крови

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ

НАБОР РЕАГЕНТОВ
D-3764

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» предназначен для количественного определения концентрации пепсиногена 2 в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Пепсиноген 2 (PG2) представляет собой белок – предшественник пепсина, синтезируется главными и щеечными клетками слизистой оболочки желудка, а так же пилорическими железами антральной части желудка и Бруннеровыми железами проксимальной части двенадцатиперстной кишки. В норме сывороточный уровень PG2 4–22 мкг/л. Соотношение концентраций пепсиногена 1 (PG1) и пепсиногена 2 в сыворотке или плазме здоровых людей больше 3:1.

1.3. Пепсиноген 2 является маркёром воспаления слизистой оболочки желудка любой этиологии, при этом его уровень становится выше нормы.

1.4. Соотношение PG1/PG2 линейно уменьшается с увеличением выраженности атрофического гастрита в области тела желудка. Это соотношение составляет менее 2,5 при выраженном атрофическом гастрите (тяжелом или умеренном) тела желудка. Показано, что риск развития рака желудка повышается при низком соотношении PG1/PG2. Тест предназначен для использования в качестве дополнительного диагностического критерия при диагностике атро-

фического гастрита с поражением тела желудка, который является фактором риска по развитию рака желудка. Определение пепсиногена 2 используется вместе с определением пепсиногена 1 для расчета их соотношения PG1/PG2.

1.5. Набор рассчитан на проведение анализа 43 неизвестных образцов, 4-х калибровочных образцов и 1 пробы контрольного образца в дублях при одновременном использовании всех стрипов планшета.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

В данном наборе реагентов используется «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител с пероксидазой, во время инкубации происходит одновременное связывание пепсиногена 2 с моноклональными антителами, иммобилизованными на лунках планшета, и конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Реакция останавливается добавлением стоп-реагента. Степень окрашивания пропорциональна концентрации пепсиногена 2 в анализируемых образцах.

Концентрацию пепсиногена 2 в анализируемых образцах определяют по калибровочному гра-

фику зависимости оптической плотности от содержания пепсиногена 2 в калибровочных образцах.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к пепсиногену 2, готовый для использования – 1 шт.;
- конъюгат моноклональных антител к пепсиногену 2 с пероксидазой хрена – 1 фл., 25 мл;
- стандартные калибровочные образцы, содержащие известные количества пепсиногена 2, готовые для использования, 0; 5; 10; 50 мкг/л – 4 фл. по 0,2 мл;
- контрольный образец с известным содержанием пепсиногена 2, готовый для использования – 1 фл., 0,2 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ плюс) – 1 фл., 13 мл;
- стоп-реагент, готовый для использования – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипетки – 16 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител с пепсиногеном 1 .

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания пепсиногена 2 в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» не превышает 8% .

3.3. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация пепсиногена 2 не превышает 1,0 мкг/л.

3.4. Клиническая проверка. Концентрации пепсиногена 1 и пепсиногена 2 измеряли у 148 здоровых лиц в возрасте 20–55 лет. Значение сывороточной концентрации пепсиногена 2 находилось в диапазоне от 4 до 22 мкг/л. Соотношение концентраций пепсиногена 1 и пепсиногена 2 (PG1/PG2) больше 3,0.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

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 пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.*

4.3. 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).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

4.5. Химическая 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 исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2 , деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

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

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм;
- шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и 650 об/мин;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 5–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50, 100 и 250 мкл;
- флаконы стеклянные вместимостью 10–15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2–8°C не более 5 суток или при температуре минус 20°C не более 3 мес. Повторное размораживание и замораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000–1500 об/мин в течение 10 мин при температуре 18–25°C.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдерживать при температуре 18–25°C не менее 30 мин.

7.2. Калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, раствор тетраметилбензидина и стоп-реагент готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

7.3. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

7.3.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

7.3.2. После первого вскрытия флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при

2–8°C в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

7.4. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°C в течение 1 месяца.

7.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор готовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) отобрать в мерный цилиндр необходимое количество концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°C до полного растворения осадка.

Хранение: до 5 суток при 2–8°C.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Количество используемых стрипов	Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл	Промысловый раствор	
			ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл
2	4,0	2,0	4,0	до 100
3	6,0	3,0	6,0	до 150
4	8,0	4,0	8,0	до 200
5	10,0	5,0	10,0	до 250
6	12,0	6,0	12,0	до 300
7	14,0	7,0	14,0	до 350
8	16,0	8,0	16,0	до 400
9	18,0	9,0	18,0	до 450
10	20,0	10,0	20,0	до 500
11	22,0	11,0	22,0	до 550
12	24,0	12,0	24,0	до 600

7.6. ПОДГОТОВКА КОНЪЮГАТА

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным конъюгатом*).

7.7. ПОДГОТОВКА РАСТВОРА ТМБ

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов), отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество раствора ТМБ.

Остатки раствора ТМБ из флакона или ванночки утилизировать (*не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ*).

Внимание! Для работы с раствором ТМБ необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

8.1. Внести в соответствующие лунки в дублях по 10 мкл каждого стандартного калибровочного образца и по 10 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 10 мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15–20 мин.

8.2. Внести во все лунки по 200 мкл конъюгата (п. 7.6.), заклеить планшет пленкой и ин-

кубировать в течение 1 часа при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые накопечники, входящие в состав набора. Остатки конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом!).

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства или многоканальной пипетки промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.5.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (п. 7.7.), заклеить планшет пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин при встряхивании на шейкере при температуре 37°C, с интенсивностью перемешивания 650 об/мин.

Для внесения раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и

одноразовые наконечники, входящие в состав набора. Остатки раствора ТМБ утилизировать (не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ!).

8.5. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности на длине волны 450 нм.

Измерение оптической плотности проводить через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА:

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 10 мкл калибровочных образцов, контрольного образца и анализируемых сывороток крови в дублях.

- Внести:** по 200 мкл конъюгата.
- Инкубировать:** 1 час, 37°C, 650 об/мин.
- Промыть:** промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
- Внести:** по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.
- Инкубировать:** 15 мин, 37°C, 650 об/мин.
- Внести:** по 100 мкл стоп-реагента.
- Измерить:** ОП при 450 нм, референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

11.2. Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации пепсиногена 2 (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.

11.3. Определить содержание концентраций пепсиногена 2 в контрольном образце и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее 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 пепсиногена 2 в образце (см. пример 1).

11.4. Контрольный образец служит для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленное по калибровочному графику значение концентрации пепсиногена 2 в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

Пример 1

Анализируемый образец, содержащий пепсиноген 2	Значение ОП о.е.	Концентрация пепсиногена 2 (определенная по графику)
50 мкг/л	2,206	–
10 мкг/л	0,532	–
5 мкг/л	0,259	–
0 мкг/л	0,008	–
Контрольный образец	0,595	11,5 мкг/л
Анализируемый образец	1,052	22,4 мкг/л

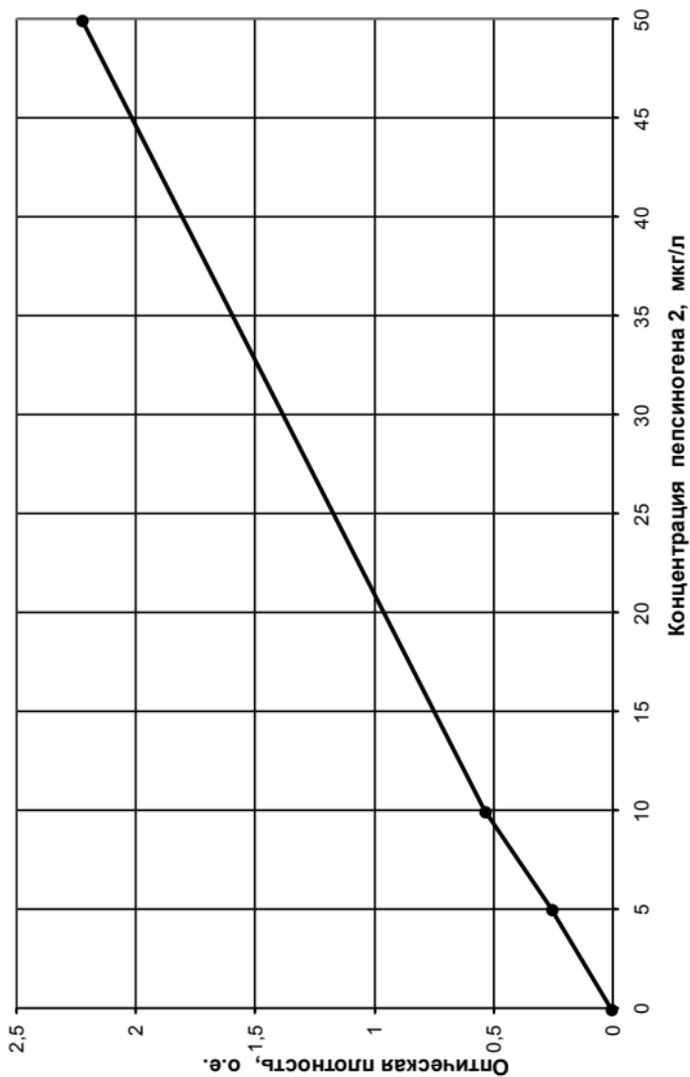


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации пепсиногена 2 в калибровочных образцах.

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

11.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации пепсиногена 2 в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор «Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°C не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. **В случае дробного использования набора** построение калибровочного графика и определение концентрации пепсиногена 2 в контрольном образце необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

12.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий

или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

**По вопросам, касающимся качества набора
«Пепсиноген 2 – ИФА – БЕСТ»,**

следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. /факс (383) 336-73-46,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться

в лабораторию ИФА гормонов и опухолевых маркеров:

тел. (383) 336-55-55

07.10.10

**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»**

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

**КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ**

Вирусные гепатиты А, В, С, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

***Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!***

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru