

НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ С БИОТИНИЛИРОВАННЫМИ АЛЛЕРГЕНАМИ

**0520960FL, 0524800FL, 0529600FL, Specific IgE
REAST**

Каталог. № : 0520960FL, 0524800FL, Методика от 04-2011
0529600FL

Количество : 96, 480, 960

Производитель: DR. Foote Laboratorien
GmbH, (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

ПРЕДПОСЫЛКИ

За последние десятилетия, аллергия значительно распространилась по миру. Под понятием аллергия подразумевается извращенная иммунная реакция типа I (реакция немедленного типа), симптомы которой, как правило, проявляются в течение 30 минут. Признаки заболевания включают: сенной насморк (ринит), конъюнктивит, крапивницу (urticaria), аллергическую астму, а как наиболее опасная форма проявления – анафилаксию (анафилактический шок). За небольшими исключениями, аллергены, вызывающие реакции типа I, относятся к группе протеинов и чаще всего имеют происхождение в природной окружающей среде, как например цветочная пыльца, волосаяной покров животных, продукты питания, клещи и яды насекомых. Характерный признак аллергии типа I – участие аллерген-специфических иммуноглобулинов (антител) класса E (sIgE). Поэтому обнаружение аллерген-специфического IgE играет центральную роль в современной диагностике аллергий.

НАЗНАЧЕНИЕ

Специфический IgE EAST служит для количественного определения специфического IgE в человеческой сыворотке или плазме и поддерживает диагностику аллергии типа I.

ПРИНЦИП МЕТОДА

IgE-антитела, присутствующие в сыворотке пациента, связываются с анти-IgE-антителами, которыми сорбированы ячейки планшета. Несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляются промывкой. Затем в ячейки добавляются биотинилированные аллергены, и происходит специфическое связывание аллергенов с IgE-антителами. Несвязавшиеся аллергены, для которых не оказалось специфических антител в данном образце, удаляются при промывке. Далее в ячейки добавляется конъюгат стрептавидин-пероксидаза, который связывается с биотином биотинилированных аллергенов. При этом количество связавшегося фермента прямо пропорционально количеству аллергена, связанного с IgE. После третьей промывки активность фермента определяется добавлением ТМБ-субстрата. Ферментная реакция останавливается добавлением 0,5 М серной кислоты (H₂SO₄), и оптическая плотность продукта реакции желтого цвета измеряется фотометрически на длине волны 450 нм и с референс-фильтром /R13 12 Tf630 нм. По прилагаемым стандартам (сыворотки с известным содержанием IgE-специфических антител, калиброванные по Международному Стандарту ВОЗ 75/502) строится калибровочная кривая. Концентрация IgE в анализируемом образце рассчитывается по стандартной кривой.

РЕАГЕНТЫ

Компоненты набора	Символы	0520960FL 0524800FL 0529600FL
Планшет, сорбированный антителами против человеческого IgE	MICROWELL	1 планшет 5 планшетов 10 планшетов
Конъюгат стрептавидин-HRP	CONJ HRP STREP	1x 16 мл 1 x 55 мл 2 x 55 мл

Концентрат промывочного буфера (25x)	WASHBUF B 25x	1 x 50 мл 1 x 110 мл 1 x 250 мл
Субстрат ТМБ	SUB TMB	1x 16 мл 1 x 55 мл 2 x 55 мл
Стоп-раствор (25 % H ₃ PO ₄)	STOP H₃PO₄	1x 16 мл 1 x 55 мл 2 x 55 мл

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Контрольная единица	Символ	07050FL
Биотинилированный конъюгат анти-IgG	BIOTIN AB E	1 x 10 мл
Калибраторы (0.35, 0.7, 3.5, 17.5, 50, 100 Ед/мл)	CAL (1-6)	6 x 1.5 мл

2. Биотинилированные аллергены	Символ	Аллерген код + FL

3. Контроли	Символ	07005/07006
Положительный контроль	CONTROL +	1 x 1мл
Отрицательный контроль	CONTROL -	1 x 1мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Пипетки на 10-100 мкл и 200-1000 мкл, многоканальная пипетка, наконечники для пипеток, пробирки для разбавления образцов, мерный цилиндр, микропланшетный фотометр, плёнка для закрытия ячеек, таймер, дистиллированная вода. Опционно: микропланшетный вошер.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для определения аллерген-специфических IgE-антител используется сыворотка или плазма пациента (образец). Никакие добавки или консерванты не нужны для поддержания целостности образца. Образцы, хранящиеся при температуре 2-8 °С, стабильны в течение 1 недели после забора крови. Если анализ не может быть проведен в течение этого времени, образец следует перенести в герметично закрывающуюся пробирку и заморозить. Как и с большинством биологических материалов, повторного замораживания образца нужно избегать. Замороженные образцы необходимо разморозить при комнатной температуре (КТ, 20-25 °С) и тщательно перемешать с помощью осторожной инверсии перед анализом. Использование гемолизированных или липемических образцов не рекомендуется.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед началом обработки довести все образцы и реагенты до комнатной температуры. Микрополоски, которые не используются, поместить в поставляемую упаковку с осушителем.

Субстратный раствор: Готов к использованию

Стоп раствор: Готов к использованию

Калибраторы и Контроли: Готов к использованию

Ферментный конъюгат: Готов к использованию

Анти-IgE Биотин: Готов к использованию

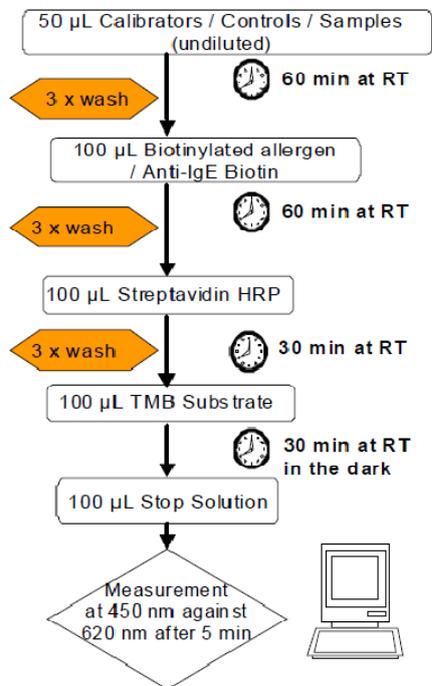
Концентрированный промывочный буфер: Концентрированный промывочный буфер развести 1:25 в дистиллированной воде (например: для 2 полосок потребуется 50 мл промывочного буфера. Поэтому, 2 мл концентрированного промывочного буфера развести до конечного объема 50 мл с дистиллированной водой). Полученный промывочный буфер стабилен в течение 1 недели.

ПРОТОКОЛ АНАЛИЗА

- Составить протокол анализа с использованием стандартов, контролей и образцов в дублях.
- Поместить необходимое количество лунок в рамку и тщательно запечатать оставшиеся полоски с осушителем.
- Пипетируйте по 50 мкл неразбавленных калибраторов, контролей и анализируемых образцов в соответствующие ячейки.
- Накрыть микропланшет и инкубировать 60 минут при комнатной температуре (20-25°C).
- Промыть микропланшет в промывочном устройстве или вручную трехкратно по 500 мкл на каждую лунку. После завершения третьего цикла удалить жидкость со дна ячейки.
- Пипетируйте в ячейки по 100 мкл биотинилированных аллергенов (для образцов и контролей) и анти-IgE конъюгат (для стандартов) согласно протоколу, накрыть микропланшет и инкубировать 60 минут при комнатной температуре (20-25°C).
- Повторить процедуру промывки (п.5).
- Пипетируйте в ячейки по 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Накрыть микропланшет и инкубировать 30 минут при комнатной температуре (20-25°C) в темноте.

9. Повторить процедуру промывки (п.5).
10. Пипетируйте по 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую ячейку и инкубировать 30 минут при комнатной температуре (20-25°C) в темноте.
11. После инкубации пипетировать 100 мкл стоп-раствора в каждую ячейку. Определить оптическую плотность образцов при 450 нм (референсная длина волны 620 нм), используя микропланшетный ридер и подсчитать концентрацию контролей и образцов, как описано ниже.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА Ручная процедура



Для автоматизированной процедуры анализа сделать запрос у производителя на конкретные настройки устройства.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения средней оптической плотности (ОП) [Δ 450-620 нм] рассчитываются из калибраторов, контролей и образцов пациентов. Построить график из средних значений ОП шести калибраторов на полулогарифмической бумаге (ось абсцисс: Log МЕд IgE/мл; ось ординат: линейная оптическая плотность Δ 450-620 нм). Концентрация sIgE образца пациента определяется на основе стандартной кривой. Средняя оптическая плотность откладывается по оси ординат, а результат в МЕд/мл может быть считан на оси абсцисс. Калибрационная кривая и контроли должны быть в установленном диапазоне Сертификата Контроля Качества, поставляемого с набором. В противном случае, условия испытаний должны быть проверены и тест, вероятно, следует повторить.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Концентрация калибратора (Ед/мл)	OD 450 нм Среднее (n=22)	Приемлемый диапазон OD 450 нм
0,35	0,106	0,074-0,138
0,7	0,161	0,113-0,209
3,5	0,568	0,398-0,738
17,5	1,619	1,133-2,105
50,0	2,558	1,791-3,325
100,0	3,015	2,111-3,920

ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

При использовании калибровочной кривой концентрации sIgE образцов подсчитываются в классах REAST и/или в интернациональных единицах на мл (Ед/мл) и оцениваются как показано ниже:

класс	МЕ/мл	концентрация специфических IgE
6	>100	крайне высокая
5	>50-100	интенсивно высокая
4	> 17.5-50	очень высокая
3	> 3.5 - 17.5	высокая
2	> 0.7 - 3.5	средняя
1	> 0.35 - 0.7	низкая
0	< 0.35	недетектируемая

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая релевантность положительного анализа отчетливо варьируется для различных аллергенов. Поэтому рекомендуется определение границ для каждого аллергена самой лабораторией. Выше перечисленные результаты могут служить основой при установлении собственных стандартных значений.

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЯ

Концентрация специфических sIgE может быть определена в диапазоне 0,35 – 100 МЕд/мл. Образцы с большей концентрацией необходимо развести и тестировать повторно для точного определения количества sIgE.

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость

1. Отклонение **в пределах одного и того же теста**

Сыворотка	Среднее значение [МЕ/мл]	Коэффициентная вариация (%)
1 (n=10)	8,6	2,0
2 (n=7)	94,6	6,6

2. Отклонение **среди различных тестов**

Сыворотка	Среднее значение [МЕ/мл]	Коэффициентная вариация (%)
1(n=20)	8,5	3,8
2 (n=16)	95,8	6,7

ЛИНЕЙНОСТЬ

Пять случайно отобранных сывороток демонстрируют линейный ход ($\pm 20\%$) на пяти следующих друг за другом этапах разбавления. Однако на основании гетерогенности проб человеческой сыворотки или плазмы можно обнаружить различающиеся результаты.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

При помощи специфического IgE REAST специфически определяется человеческий IgE. В физиологических концентрациях нельзя было доказать перекрестную реактивность с другими классами Ig (IgA, IgD, IgM, IgG).

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный метод имеет следующие ограничения:

- Отрицательный анализ не исключает аллергию I типа.
- Результат теста следует рассматривать только с учетом анамнеза
- Для проб с очень высоким уровнем концентрации общего IgE (> 1000 МЕд/мл) измеренные показатели sIgE могут быть ниже действительного уровня.
- При использовании смесей аллергенов доступны только полуколичественные результаты.

МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

1. В соответствии с пунктом 2b статьи 1 Европейской директивы 98/79/ЕС использование лабораторных диагностических медицинских приборов предназначено для обеспечения пригодности, производительности и безопасности продукта производителем. Поэтому процедура испытания, информация, меры предосторожности и предупреждения, приведенные в инструкции по применению должны строго соблюдаться. Набор может быть использован только, как описано на стр. 1 (применение по назначению).
2. Провести тест строго по инструкциям, данным в руководстве по эксплуатации, содержащем всю необходимую информацию, сведения о мерах безопасности и предупреждения. В случае применения тестового набора с другими приборами для диагностики следует установить пригодность метода теста. Любое изменение внешнего вида, состава и проведения теста, а также применение в сочетании с другими изделиями, не авторизованными изготовителем, запрещены; за подобные изменения пользователь отвечает лично. Изготовитель не несет ответственность за неверные результаты или за происшествия, вытекающие из этого. Изготовитель также не отвечает за неверные результаты, являющиеся следствием визуальной оценки.
3. Набор реагентов предназначен только для исследовательских целей. Беременным сотрудникам лаборатории запрещено проводить этот тест.
4. Лабораторное оборудование должно поддерживаться в соответствии с инструкциями изготовителя и должны быть проверены на его правильное функционирование перед использованием.
5. Реагенты предназначены для одноразового использования. Только для определения in vitro. Не использовать реактивы после истечения срока годности.

6. Не используйте компоненты набора, когда пакет поврежден. Пожалуйста, проверьте все растворы перед использованием на наличие микробиологического загрязнения. Закройте флаконы плотно сразу после использования во избежание испарения и микробиологического загрязнения. Не путать колпачки реагентов на флаконах.
7. Настоящий тестовый набор оптимизирован для температур, указанных в схеме проведения теста (см. стр. 2). При наличии температур, не соответствующих назначению, результаты могут отклоняться от эталонных диапазонов.
8. Процедура промывки абсолютно важна. Неправильное мытье может привести к ошибочным результатам. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку и автоматизированный вошер.
9. Чтобы избежать перекрестного загрязнения и ложноположительных результатов рекомендуется выполнять все шаги пипетирования должным образом. Используйте только чистые наконечники для пипеток, диспенсеры и лабораторное оборудование.
10. Компоненты набора, полученные из материалов человеческого происхождения, были проверены и найдены отрицательными на HbsAg, HIV1/HIV2 и HCV-антитела. Однако так как никакие известные методы не гарантируют отсутствия инфекционных агентов, обращайтесь со всеми компонентами и образцами пациентов как с потенциально инфекционно опасными.
11. Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин, который, по заявлению производителя, не заразен. В связи с возможностью возникновения неопределяемых инфекционных агентов мы рекомендуем обращаться с любым продуктом животного происхождения как с потенциально инфицированным.
12. Обратите особое внимание на следующие правила по охране труда:
 - Прием еды, напитков и курение во время работы запрещено.
 - Серная кислота – едкая; пробы сыворотки – потенциально инфекционные. Конъюгат, буфер-разбавитель, стандарты и контроли содержат $\leq 0,2$ % Бронидокса Л; промывочный буфер содержит $\leq 0,038$ % Тиомерсала.
 - Работу с реактивами набора или клиническими пробками проводить в одноразовых перчатках; после работы вымыть руки.
 - Проводить пипетирование не ртом, а только нормированным устройством для дозирования.
 - Избегать контакта с кожей.
 - Отходы, содержащие сыворотку, должны быть собраны в отдельный контейнер с добавленными дезинфицирующими веществами согласно национальным руководствам.
13. Стоп-раствор вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз (H314).
14. ТМВ в высоких концентрациях может быть потенциально мутагенным. В связи с низкой концентрацией ТМВ в этом растворе субстрата мутагенный эффект может быть исключен, если он используется должным образом.
15. Консерванты (Bronidix, тимеросал Azid) являются токсичными для водных организмов, но их концентрация не представляет опасности для окружающей среды. При уничтожении, промойте большие объемы реагентов с большим количеством воды. Тимеросал (WASHBUF B) может вызвать повреждение органов в результате длительного или многократного воздействия (H373)
16. Отходы, содержащие сыворотки, должны быть собраны в отдельных контейнерах, содержащих соответствующее дезинфицирующее средство в достаточной концентрации. Этот материал должен рассматриваться в соответствии с руководящими принципами или инструкциями.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»