

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СПЕЦ-IgE-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации аллерген-специфического IgE в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Специфические иммуноглобулины класса E (sIgE) участвуют в развитии аллергии I (немедленного) типа, симптомы которой (сенной насморк, конъюнктивит, крапивница, астма, анафилактический шок), проявляются, как правило, в течение 30 минут. Обнаружение аллерген-специфического IgE в сыворотке или плазме служит для диагностики аллергии I типа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение аллерген-специфического IgE основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к IgE. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgE, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью биотинилированного аллергена и конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидаина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации аллерген-специфического IgE в исследуемом образце. Концентрацию аллерген-специфического IgE в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания аллерген-специфического IgE в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование мышиных моноклональных антител к IgE позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания аллерген-специфического IgE в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СПЕЦ-IgE-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации аллерген-специфического IgE в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей аллерген-специфического IgE, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.35-17.5 МЕ/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации аллерген-специфического IgE предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0.7 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «СПЕЦ-IgE-ИФА» концентрация аллерген-специфического IgE в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.1 МЕ/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P200SZ	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C200SZ	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества аллерген-специфического IgE - 0; 0.35; 0.7; 3.5; 17.5 МЕ/мл , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q200SZ	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием аллерген-специфического IgE, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
4	T200SZ	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	B200SZ	anti-IgE BIOTIN	Биотинилированные антитела к IgE, готовые к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
9	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K200SIR	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА», русская	1	шт	-
11	K200SQ	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА»	1	шт	-
*	Allergen-BIOTIN Биотинилированные аллергены (готовы к использованию, по 5 мл каждый, прозрачные жидкости синего цвета) 1. D клещ домашней пыли (смесь родов Dermatophagoides spp.) (флакон с синей крышкой) 2. E1 эпидермис кошки (флакон с красной крышкой) 3. E2 эпидермис собаки (флакон с желтой крышкой) 4. Gx смесь пыльцы злаков (тимофеевка, ежа, овсяница, мятлик, лисохвост, пырей, рожь посевная) (флакон с сиреневой крышкой) 5. WS смесь пыльцы сорных трав (полынь обыкновенная, полынь горькая) (флакон с белой крышкой) 6. T смесь пыльцы деревьев (береза, ольха, орешник) (флакон с зеленой крышкой)					

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

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

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- орбитальный шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600-800 об/мин;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, анти-IgE Биотин, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- биотинилированные аллергены следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2-8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 5 суток или при температуре +2-8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови.

Замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается!

Сыворотку (плазму) крови следует хранить при температуре +4 °С не более 7 суток

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации аллерген-специфического IgE в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. Отметьте лунки, предназначенные для калибровочных проб и для исследуемых образцов.
2	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
3	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +18-25°C и постоянном встряхивании со скоростью 600-800 об/мин.
4	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалить остатки жидкости из лунок.
5	ВНИМАТЕЛЬНО! Внесите лунки для калибровочных проб и контрольной сыворотки по 100 мкл биотинилированных антител (B200SZ), а в лунки для исследуемых образцов соответствующий биотинилированный аллерген.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +18-25°C и постоянном встряхивании со скоростью 600-800 об/мин.
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 3 раза.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18-25 °C и постоянном встряхивании со скоростью 600-800 об/мин.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
14	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) - концентрация СПЕЦ-IgE в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат (y) - оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
15	Определите по калибровочному графику содержание СПЕЦ-IgE в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций аллерген-специфического IgE в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.1 МЕ/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (17.5 МЕ/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация СПЕЦ-IgE ниже 0.1 МЕ/мл или выше 17.5 МЕ/мл.

RAST-Класс	Единицы	
	МЕ/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
0 - неопределяемый	-	<0.35
1 - низкий	0.35	0.7
2 - средний	0.7	3.5
3 - высокий	3.5	17.5
4 - очень высокий	17.5	-

По вопросам, касающимся качества Набора **«СПЕЦ-IgE-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин