



## НАБОРА ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА E В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

Кат. № : KP27EW; KP27EWB  
Количество : 96; 192  
Производитель : Radim (Италия)

Методика 03-2006  
Версия 14

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

### ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

#### 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Роль антител класса IgE в возникновении и развитии аллергических реакций известна уже достаточно давно. Связанные с поверхностью базофилов IgE-антитела, реагируют с антигенами за счет Fab фрагмента своей молекулы. После связывания IgE с аллергеном базофилы выделяют ряд вазоактивных веществ, которые определяют развитие аллергической симптоматики. Выявление и количественное определение концентрации аллерген-специфических IgE имеет большое значение при диагностике и исследовании аллергических заболеваний для выбора адекватной терапии.

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный набор позволяет количественно измерять концентрацию аллерген-специфического IgE в сыворотке крови человека методом двухстадийного «захватывающего» иммуноферментного анализа. На первой стадии исследуемые образцы инкубируют с растворами биотинилированных аллергенов в лунках микропланшета, поверхность которых покрыта моноклональными антителами к IgE человека. В процессе инкубации молекулы IgE, содержащиеся в образце, связываются с твердой фазой. Если среди них имеются IgE, специфичные к конкретным аллергенам, то одновременно происходит связывание биотинилированного аллергена с молекулой аллерген-специфического IgE. После удаления несвязавшегося материала и последующего промывания, в лунки добавляется конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. Во время второй инкубации конъюгат стрептавидин-пероксидаза связывается с биотинилированным аллергеном. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству аллерген-специфического IgE в образцах. Измерение оптической плотности производится на спектрофотометре при длине волны 450нм и 405нм.

Для количественного выражения концентрации специфического IgE на тот же микропланшет наносятся калибровочные пробы с известными концентрациями общего IgE, которые инкубируются с конъюгатом анти-IgE-биотин. Вторая инкубация с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза проводится одинаково для образцов и калибровочных проб. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация специфического IgE в образцах. Концентрация выражается в Международных Единицах (МЕ) общего IgE.

#### 3. В СОСТАВ "С.А.Р.Л.А. SYSTEM" ВХОДЯТ СЛЕДУЮЩИЕ НАБОРЫ:

- Хранить при 2-8 °С.
- Срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.
- После вскрытия набор стабилен в течении 2 месяцев при 2-8 °С.

Комплект для проведения иммуноферментной реакции (**Enzymatic Set**) выпускается в двух вариантах комплектации: на 96 определений и на 192 определения. В таблице 1 указаны количества компонентов в зависимости от варианта комплектации.

Наименование компонента	Количество компонента в зависимости от варианта комплектации	
	96 определений	192 определения
<b>MTP, Покрытый микропланшет:</b> делимые лунки, покрытые мышинным моноклональным анти-человеческим-IgE антителом. Храните неиспользованные лунки при 2-8 °С в тщательно закрытой соответствующей пластиковой сумке.		
<b>CONJ, Ферментный Конъюгат:</b> Стрептавидин-пероксидаза. Готовый к использованию. Консервант: неомоцилин.	1 x 23 мл	1 x 50 мл
<b>DIL, Разбавитель образца:</b> сыворотка животного. Готов к использованию. Консервант: NaN <sub>3</sub> (<0.1%).	1 x 6 мл	2 x 6 мл
<b>WASH, промывочный раствор (концентрированный):</b> PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Возьмите флакон, емкостью 500 мл с дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, ресуспендируйте раствор. Поместив его на несколько минут в температуру 37°С. Храните разбавленный промывочный раствор в течении 30 дней при 2-8°С.	1 x 50 мл	2 x 50 мл
<b>TMB хромоген:</b> Тетраметилбензидин с цитрат-, фосфатным буфером, DMSO и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	2 x 15 мл	6 x 15 мл
<b>STOP, Стоп-реагент:</b> 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Готов к использованию.	1 x 14 мл	2 x 14 мл
<b>CPA, Самоклеящаяся пленка для закрывания планшета.</b>		
Пластиковый пакет.	1 шт.	1 шт.

#### 3.2. Комплект калибровочных проб (**Calibrators set**). Состоит из следующих компонентов:

- **CAL, IgE калибраторы:** 6 флаконов (по 1,5мл) человеческого IgE на основе сыворотки в концентрациях: 0; 0,5; 1; 5; 25 и 100 МЕ/мл. готовы к использованию. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.01%).
- **BIO, анти-IgE-биотин:** 1флакон (5,5мл) анти-человеческих-IgE антител, конъюгированных с биотином. Готов к использованию. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%).

**3.3.** Комплект аллергенов (**ALL**), содержащий флаконы с биотинилированными аллергенами – лиофилизированными препаратами или жидкостями (по 3 мл во флаконе). Разведите лиофилизованные аллергены, добавив 3 мл дистиллированной воды, тщательно перемешайте. После реконституции, храните аллерген-биотин раствор при 2-8°C в течение 2 месяцев. Для более длительного хранения рекомендуется заморозить до -20°C. Раствор может быть заморожен и разморожен до 4-5 раз, без потери его связывающих качеств. Жидкие аллергены готовы к использованию.

**3.4.** Контрольная сыворотка **CTR, C.A.R.L.A.-check** с известным содержанием специфических IgE к пяти часто встречающимся аллергенам. Лиофилизированный препарат. Воссоздать добавлением 1 мл дистиллированной воды во флакон и тщательно перемешайте. После воссоздания храните контрольную сыворотку при 2-8°C в течении недели. Для более длительного хранения рекомендуется заморозить до -20°C. Ожидаемые значения специфических IgE указаны в паспорте контрольной сыворотки.

#### 4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

##### 4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными наконечниками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2°C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный встряхиватель, настроенный на 1200 об./мин.
- Микропланшетный спектрофотометр для измерения абсорбций с интервалом 0-3,0 А при 450 и 405 нм.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

##### 4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

#### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

**Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:**

- Не смешивайте специфичные реагенты из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащей загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре,
 это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

**Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:**

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

#### 6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Хранить образцы при 2-8°C в течении 7 дней. Для более длительного хранения рекомендуется заморозить до -20°C. Перед проведением анализа удостоверьтесь, что все образцы хорошо очищены. Избегайте повторного замораживания и размораживания.

**7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

- Позвольте реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры.
- Переверачивая образцы, смешайте их перед использованием.

- 7.1 Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов и образцов (одну лунку для каждого анализируемого аллергена для 1 пациента).
- 7.2 Внесите **100 мкл** каждого калибратора в соответствующие лунки.
- 7.3 Внесите **50 мкл** каждого образца в соответствующие лунки.
- 7.4 Внесите **50 мкл** разбавителя образца во все лунки образцов.
- 7.5 Внесите **100 мкл** анти-IgG-биотина в лунки калибраторов.
- 7.6 Внесите **100 мкл** разных биотинилированных аллергенов лунки образцов, по желаемой рабочей схеме.
- 7.7 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при комнатной температуре (18-25°C)** на орбитальном встряхивателе (1200 об./мин.).
- 7.8 Удалите самоклеющуюся пленку и осторожно соберите инкубационную смесь со всех лунок. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Соберите всю жидкость из лунок.
- 7.9 Внесите **200 мкл** ферментного конъюгата во все лунки, кроме лунки бланка.
- 7.10 Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при комнатной температуре (18-25°C)** на орбитальном встряхивателе (1200 об./мин.).
- 7.11 Удалите самоклеющуюся пленку и осторожно соберите инкубационную смесь со всех лунок. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Соберите всю жидкость из лунок.
- 7.12 Внесите **200 мкл** хромогена во все лунки.
- 7.13 Инкубируйте в течении **15 минут при комнатной температуре (18-25°C)** на орбитальном встряхивателе (1200 об./мин.), избегайте прямого солнечного света.
- 7.14 Внесите **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
- 7.15 Считайте абсорбцию лунок желательно с помощью бихроматичного спектрофотометра при **450 нм** с контрольной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка). В случае избытка значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание должно быть завершено в течении **15 минут** после завершения анализа.

\* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

**8. СХЕМА АНАЛИЗА** (см. стр. 24 данной инструкции).**9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Чтобы получить лучшую чувствительность данный метод использует фотометрическое считывание при 2 разных волнах (450 и 405 нм). Для образцов с концентрациями IgG в диапазоне от 0 до 25 МЕ/мл следует считывать при 450 нм; для образцов с уровнями IgG выше 25 МЕ/мл, считывать при 405 нм.

Выведите калибровочную кривую на линейной графической бумаге, выводя концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации аллерген-специфического IgE в МЕ/мл получают путем интерполяции абсорбции каждого образца, анализируемого с разными аллергенами и путем умножения концентрации из калибровочной кривой на 2 (коэффициент разбавления образца).

\*При использовании автоматических микропланшетных аппаратов SEAC или Radim, спектрофотометрическое считывание будет проводится автоматически при 3 разных волнах длиной: 450, 405 и 620 нм, позволяя этим расширить диапазон калибровочной кривой.

**9.1 Пример вычисления**

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	Абсорбция 450 нм	Специфические IgE	Абсорбция 405 нм	Специфические IgE
Калибратор 0МЕ/мл	0,0		0,0	.
Калибратор 0,5МЕ/мл	0,094		0,033	.
Калибратор 1МЕ/мл	0,197		0,070	.
Калибратор 5МЕ/мл	0,958		0,342	.
Калибратор 25МЕ/мл	2,900		1,035	.
Калибратор 100МЕ/мл	>3,000		2,178	.
Образец 1 Аллерген W19 Постенница лекарственная <i>Parietaria officinalis</i>	0,360	3,4 МЕ/мл	.	.
Образец 2 Аллерген D1 <i>Dermatophagoides pteronyssimus</i>	1,848	26 МЕ/мл	.	.
Образец 3 Аллерген G5 Колосок душистый <i>Anthoxanthum odoratum</i>	0,025	0 МЕ/мл	.	.
Образец 4 Аллерген T9 Оливки <i>Olea europaea</i>	>3,000		2,071	186 МЕ/мл

**9.2 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Для клинической целей. Концентрации специфического IgE могут быть оценены следующим образом:

Описание	Един.	Клас	Уровень специфического IgE
< 0.5	МЕ/мл	0	Отсутствует или неопределяемый
0.51-1.0	МЕ/мл	1	Низкий
1.1-5.0	МЕ/мл	2	Умеренный
5.1-25.0	МЕ/мл	3	Высокий
25.1-75.0	МЕ/мл	4	Очень высокий
> 75.0	МЕ/мл	5	Крайне высокий

**10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА****10.1. Специфичность**

Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к IgE, использованных при изготовлении набора, с иммуноглобулинами классов А, G, М и D.

**10.2. Чувствительность**

Минимальная достоверно определяемая набором концентрация специфического IgE в сыворотке крови человека не превышает **0,15МЕ/мл**.

**10.3. Точность**

Точность была оценена путем определения повторяемости и воспроизводимости анализа (вариативности внутри и между анализами) в 3 сыворотках при разных концентрациях специфического IgE для разных аллергенов.

**Повторяемость (внутри анализа)**

Сыворотка	Аллерген	Среднее ± МЕ/мл СО	Кoeffициент вариации	Количество репликатов
1	D1	1,24 ± 0,06	4,8	10
2	E1	18,70 ± 0,58	3,1	10
3	G5	24,65 ± 1,14	4,6	10

**Воспроизводимость (между анализами)**

Сыворотка	Аллерген	Среднее ± МЕ/мл СО	Кoeffициент вариации	Количество репликатов
1	D1	1,21 ± 0,11	9,1	10
2	E1	16,16 ± 1,60	9,9	10
3	G5	25,06 ± 2,05	8,2	10

**11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА**

Замечание по применению лекарств: пенициллина G, пенициллина V, цефалоспорина, ампициллина и амоксициллина.

- Отрицательный результат в анализе in vitro на специфический IgG по отношению к лекарствам, указанным выше, не исключает клинической гиперчувствительности к этим аллергенам. По сути, такой результат может быть определен специфической активностью IgE или путем проведения анализа образцов крови, взятых в неподходящее время (перед началом циркуляции в крови специфического IgE или после уменьшения концентрации образцов).
- Тем не менее, отрицательность специфического IgE к пище и пункциям ядами не исключает наличия или возможного развития клинической гиперчувствительности к этим аллергенам.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)