Утверждена
приказом Росздравнадзора
от 27.02.2008 г. №1189 Пр/08

Инструкция
по применению набора реагентов для полуколичественного иммуноферментного определения аллергенспецифических IgG-антител в сыворотке крови (IgG-АТ-ИФА)

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов IgG-АТ-ИФА предназначен для полуколичественного определения содержания аллергенспецифических IgG в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение аллергенспецифических IgG используется в клинической практике для диагностики аллергических заболеваний, вызванных пыльцевыми, бытовыми, пищевыми, эпидермальными и другими аллергенами.

1.3. Набор рассчитан на определение содержания аллергенспецифических IgG в 8 образцах сыворотки крови к 22 видам аллергенов.

2. Принцип метода.

2.1. Принцип метода - твердофазный неконкурентный непрямой иммуноферментный анализ. В наборе использованы моноклональные анти-IgG-антитела, входящие в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса иммуноглобулина G, которые аффинно взаимодействуют с аллергенами, сорбированными на поверхности полистиролового планшета. Не связавшиеся компоненты анализируемой пробы и избыток конъюгата отмываются, а активность пероксидазы в составе иммунных комплексов определяют с помощью хромогенного субстрата (ТМБ).

Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (ТМБ - тетраметилбензидина) в окрашенное соединение, количество которого пропорционально содержанию IgG-антител к соответствующему аллергену в анализируемом образце.

Результаты анализа регистрируют с помощью фотометра вертикального сканирования при длине волны 450 нм.

3. Состав набора.

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет полистироловый 96-луночный наборный [один 8-луночный стрип, покрытый моноклональными анти-IgG-АТ (референс-стрип), маркирован P_1, и одиннадцать 8-луночных стрипов, покрытых аллергенами 22 видов, маркированы P_3] - 2 шт.;

Примечание. Перечень тестируемых аллергенов определяется по согласованию с потребителем.

- калибровочные пробы на основе эмбриональной телячьей сыворотки с использованием препарата IgG человека и азида натрия 0,1%, содержащие известные количества IgG - 0, 0,88, 8,8, 88 и 880 мкг/мл, аттестованные по стандарту ВОЗ для IgG человека IRP 67/97, маркированы P_2, готовые к применению - 5 флаконов (по 0,07 мл);
- конъюгат моноклональных антител к IgG с пероксидазой хрена, 100-кратный концентрат, маркирован P_4 - 1 флакон (0,25 мл);
- промывающий раствор, 10-кратный концентрат [трис(оксиметил)аминометан, 3,6 г; 1 М раствор соляной кислоты; натрия хлорид, 5,1 г; твин-20, 0,3 мл], pH 7,4, маркирован P_5 - 1 флакон (30 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), маркирован P_6, готовый к применению - 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент (1 N раствор серной кислоты), маркирован P_7, готовый к применению - 1 флакон (12 мл);
- трафарет для анализа - 1 шт.;
- инструкция по применению.

4. Аналитические характеристики набора.

4.1. Чувствительность набора (минимально определяемая концентрация) составляет не менее 0,88 мкг/мл, что соответствует I классу RAST.

5. Анализируемые образцы.

5.1. Негемолизированная прозрачная сыворотка крови человека.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 дней или при температуре -20 °С и ниже не более 3 месяцев.

Повторное замораживание образцов не допускается.

6. Меры предосторожности.

6.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

6.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях, за исключением стоп-реагента (1 N раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием; следует избегать его разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.3. 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.).

6.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий производить измерение оптической плотности в лунках планшета при длине волны 450 нм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные и многоканальные варьирующие со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 10-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка ±3%);
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер);
- термостат, поддерживающий температуру 37±1 °С;
- холодильник бытовой;
- колба мерная вместимостью 500 мл;
- стакан мерный вместимостью 25 мл;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

8. Подготовка к анализу.

8.1. Извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты при комнатной температуре (18-25 °С) в течение времени не менее 30 минут.*

8.2. Приготовление рабочего промывающего раствора.

К одному объему содержимого флакона P_5 добавить 9 объемов дистиллированной воды и тщательно перемешать.

Рабочий промывающий раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 10 дней.

8.3. Приготовление рабочего раствора конъюгата.**

В стакан мерный вместимостью 25 мл перенести содержимое флакона P_4, довести до метки 20 мл рабочим промывающим раствором (п. 8.2) и перемешать. Готовить за 30 минут перед использованием!

Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 дней.

9. Проведение анализа.

Пробы вносить в соответствии со схемой расположения на планшетах.

Схема

		Наименование аллергенов											
A	$КП_{880}$												
B	$КП_{88}$												
C	$КП_{8,8}$												
D	$КП_{0,88}$												
E	$КП_{0}$												
F													
G													
H													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Схема

		Наименование аллергенов											
A	$КП_{880}$												
B	$КП_{88}$												
C	$КП_{8,8}$												
D	$КП_{0,88}$												
E	$КП_{0}$												
F													
G													
H													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

9.1. Во все лунки планшета внести по 90 мкл рабочего промывающего раствора (п. 8.2).

9.2. Внести в лунки А-Е первого ряда по 10 мкл калибровочных проб, а в остальные лунки внести в дублях по 10 мкл анализируемых проб сыворотки крови.

Время внесения проб в лунки одного планшета не должно превышать 15 минут.

9.3. Закрыть планшет крышкой и перемешать содержимое планшета на шейкере в течение 1 минуты, после чего инкубировать при температуре 37 °С в течение 1 часа.

9.4. После завершения инкубации удалить жидкость из лунок планшета путем стряхивания, после чего добавить во все лунки планшета по 150 мкл рабочего промывающего раствора и через 1 минуту удалить жидкость путем стряхивания.

Процедуру промывки повторить еще два раза.

9.5. Внести во все лунки планшета по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 8.3), инкубировать при температуре 37 °С в течение 1 часа и удалить жидкость из лунок путем стряхивания. Промыть лунки планшета так, как это указано в п. 9.4, после чего промыть лунки планшета дистиллированной водой 2 раза.

После окончания последней промывки удалить следы жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом состоянии по фильтровальной бумаге.

9.6. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ ($Р_6$) и инкубировать планшет в темном месте при комнатной температуре (18-25 °С) в течение 3-15 минут в зависимости от степени развития голубого окрашивания.

9.7. Добавить во все лунки по 50 мкл стоп-реагента ($Р_7$); при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

9.8. Измерить оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм в течение времени не более 5 минут после остановки реакции.

9.9. Оптическая плотность калибровочной пробы, содержащей 880 мкг/мл IgG, должна быть не менее 1,5.

9.10. Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации IgG в мкг/мл, по оси ординат - оптическую плотность при длине волны 450 нм.

9.11. Найти по калибровочному графику значения концентраций специфических IgG в анализируемых образцах.

9.12. Полученные значения концентрации образцов в мкг/мл необходимо интерпретировать согласно таблице.

Таблица

Концентрация специфических IgG (мкг/мл)	Класс	Интерпретация
	0	Отрицательный
(0-0,88]	1	Легкая аллергическая реакция
(0,88-8,8]	2	Умеренная аллергическая реакция
(8,8-88]	3	Высокая аллергическая реакция
(88-880]	4	Очень высокая аллергическая реакция

10. Условия хранения и эксплуатации набора.

10.1. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 ºС не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Срок годности набора - 6 месяцев.

10.3. Вскрытые стрипы хранению не подлежат.

10.4. Калибровочные пробы после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8 °С не более 7 дней или при температуре -20 °С (и ниже) не более 2 месяцев.

10.5. Конъюгат (100-кратный концентрат) после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 1 месяца.

10.6. Концентрат промывающего раствора и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

10.7. ТМБ после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 месяцев.

10.8. Рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре 2-8 °С не более 2 дней.

10.9. Рабочий промывающий раствор можно хранить при температуре 2-8 °С не более 10 дней.

10.10. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов других фирм-производителей.

10.11. При проведении исследований следует учесть, что при использовании каждого планшета необходимо обязательно анализировать калибровочные пробы.

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

По вопросам, касающимся качества набора IgG-АТ-ИФА, следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс» по адресу: 355021, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177Г, стр. 1, телефон +7(8652) 28-34-60

и в ФГУ «НИИ Физико-химической медицины» ФМБА России, по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1а, тел. (499) 246-44-50.

***- Уважаемые клиенты! Обращаем Ваше внимание** на то, что объем конъюгата (0,25 мл) и калибровочных проб (0,07 мл) очень мал. Из-за того, что транспортные компании, несмотря на маркировку, переворачивают груз, жидкость затекает в крышку пробирки, и у Вас может создаться впечатление, что пробирка пустая.

Со своей стороны, мы гарантируем, что:

1. используем только проверенные и герметичные пробирки;

2. все реагенты проходят двойной контроль перед упаковкой и возможность того, что «какой-то реагент забыли налить» исключена.

Пожалуйста, постучите закрытой пробиркой по твердой поверхности несколько раз и, мы уверены, что Вы обнаружите конъюгат на месте. Спасибо за понимание!

****- Таблица приготовления рабочего раствора конъюгата**

количество планшетов	объем конъюгата	объем промывающего раствора
1	100 мкл	9,900 мл
2	200 мкл	19,800 мл