

ОКП (РФ) 939817

«Утверждаю»
Директор
ООО НПО «Иммунотэкс»
_____ М.В. Батурин
« ____ » _____ 20__ г.

Инструкция по применению

**Набор реагентов для иммуноферментного определения
специфических IgG₄-антител в сыворотке крови (IgG₄-АТ-ИФА)
по ТУ 9398-012-73678649-2013**

производства ООО НПО «Иммунотэкс»

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов IgG₄-АТ-ИФА предназначен для определения содержания специфических IgG₄-антител в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа к 20 видам аллергенов: аллерген из коровьего молока, аллерген из белка куриных яиц, аллерген из желтка куриных яиц, аллерген из пшеничной муки, аллерген из гречневой крупы, аллерген из овсяной крупы, аллерген из говядины, аллерген из мяса курицы, аллерген из свинины, аллерген из трески, аллерген из апельсина, аллерген из пыльцы березы, аллерген из пыльцы тимopheевки, аллерген из пыльцы амброзии, аллерген из домашней пыли, аллерген из *D. pteronyssinus*, аллерген из шерсти собаки, аллерген из *Candida albicans*, аллерген из *Alternaria tenuis*, аллерген из *Aspergillus*, далее по тексту - набор.

(Примечание. Перечень тестируемых аллергенов определяется по согласованию с потребителем).

1.2. Известно, что иммунный ответ на каждый аллерген генетически детерминирован. В зависимости от особенностей иммунной реактивности человека, аллергическая реакция может развиваться по различным механизмам иммунного ответа - как IgG-опосредованного типа, так и не IgG-опосредованного типа. Установленным фактом является также увеличение сывороточной концентрации IgG₄-антител при гипосенсибилизирующей аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) больных с IgG-опосредованной аллергией. Настоящий набор реагентов «IgG₄-АТ-ИФА» используется в клинической практике для диагностики аллергических заболеваний, идентификации аллергенов при пищевой непереносимости, а также для оценки блокирующей активности специфических IgG₄-АТ и контроля их лечебной эффективности в ходе проведения АСИТ различными аллергенами (пищевыми, пыльцевыми, бытовыми и др. видами). Использование набора IgG₄-АТ-ИФА позволяет разрабатывать специализированные программы лечения и оценки эффективности иммунотерапии. Этот тест применим в практике работы аллергологов, клинических иммунологов, диетологов.

1.3. Набор рассчитан на определение содержания специфических IgG₄-антител в 160 образцах сыворотки крови и 5 образцах калибровочных проб в дублях (всего 170 определений).

2. Принцип метода.

2.1. Принцип метода – твердофазный неконкурентный непрямой иммуноферментный анализ. В наборе использованы 2 вида моноклональных анти-IgG₄-антител, одни из которых используются для покрытия референс-стрипов, вторые - входят в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса IgG₄, которые аффинно взаимодействуют с аллергенами, сорбированными на поверхности полистиролового планшета. Конъюгат МКАТ против IgG₄ не имеет перекрестных реакций с IgE, IgA, IgD и IgM.

Активность пероксидазы определяют по разложению субстрата - перекиси водорода. Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (ТМБ - тетраметилбензидина) в окрашенное соединение, количество которого пропорционально содержанию IgG₄-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, маркирован **P1**, **P2** (два 8-луночных стрипа, покрытых моноклональными анти-IgG₄-антителами (МКАТ-анти-IgG₄) - референс-стрипы и десять 8-луночных стрипов, покрытых аллергенами 10 видов) - 2 шт.

- калибровочные пробы (КП) на основе сыворотки крови плодов коровы (жидкой) с использованием препарата IgG₄ человека и мертиолята натрия, содержащие известные количества IgG₄, в нг/мл: 5000 (КП_А – 4 кл.), 1500 (КП_В – 3 кл.), 500 (КП_С – 2 кл.), 150 (КП_Д – 1 кл.), 0 (КП₀ – 0 кл.); калибровочные пробы аттестованы по стандарту ВОЗ для IgG₄ человека IRP 67/97, маркированы **P3**, готовы к применению - 5 флаконов (по 0,07 мл);

- конъюгат моноклональных антител к IgG₄ с пероксидазой хрена, 100-кратный концентрат (МКАТ-анти-IgG₄), маркирован **P4** - 1 флакон (0,25 мл);
- промывающий раствор, 10-кратный концентрат [трис(оксиметил)аминометан, 3,6 г; 1 М раствор соляной кислоты; натрий хлористый, 5,1 г; твин-20, 0,3 мл], рН=7,4±0,1, маркирован **P5** - 1 флакон (30 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), маркирован **P6**, готовый к применению – 1 флакон (22 мл);
- стоп-реагент (1N раствор серной кислоты), маркирован **P7**, готовый к применению - 1 флакон (12 мл);
- трафарет для анализа - 1 шт.;
- инструкция по применению.

4. Аналитические характеристики набора.

4.1. Чувствительность определения. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgG₄ в сыворотке крови человека составляет не выше 15 нг/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. Перед проведением анализа образцы анализируемых сывороток развести в 10 раз рабочим промывающим раствором (п. 8.2.).

Повторное замораживание образцов не допускается.

6. Меры предосторожности.

6.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

6.2. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые перчатки.

6.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

6.4. Стоп-реагент (1N раствор серной кислоты) 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. После этого следует еще раз промыть пораженный участок кожи мыльной водой или раствором пищевой соды.

6.5. 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.).

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 $\pm 3\%$);

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер);

- термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С;

- холодильник бытовой;

- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;

- стакан мерный вместимостью 25 мл;

- бумага фильтровальная;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые хирургические.

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 **P5** 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 100 мкл из флакона **P4**, довести до 10 мл рабочим промывающим раствором (см. 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.

8.4. Подготовить анализируемые пробы. Анализируемые образцы сывороток развести в 10 раз рабочим промывающим раствором (п. 8.2.).

8.5. Составить схему расположения исследуемых образцов на прилагаемом трафарете.

9. Проведение анализа.

9.1. Использовать только одноразовые наконечники для каждого образца.

9.2. Время внесения в лунки планшета калибровочных проб и образцов сывороток не должно превышать 15 мин. Время инкубации необходимо исчислять от момента внесения реагента в последнюю лунку.

9.3. Образцы вносят в соответствии со схемой их расположения на трафарете (схема 1).

Схема 1

Референс-система		Стрипы, сорбированные аллергенами. Образцы сывороток (ОС)											
A	КП ₅₀₀₀ КП ₅₀₀₀	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73		
B	КП ₁₅₀₀ КП ₁₅₀₀	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74		
C	КП ₅₀₀ КП ₅₀₀	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75		
D	КП ₁₅₀ КП ₁₅₀	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76		
E	КП ₀ КП ₀	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77		
F		6	14	22	30	38	46	54	62	70	78		
G		7	15	23	31	39	47	55	63	71	79		
H		8	16	24	32	40	48	56	64	72	80		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

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

9.5. Внести в лунки А-Е первого и второго ряда по 10 мкл калибровочных проб (КП), нг/мл (КП₅₀₀₀, КП₁₅₀₀, КП₅₀₀, КП₁₅₀, КП₀). В лунки А-Н с третьего по двенадцатый ряды внести образцы сывороток по 10 мкл.

9.6. Закрыть планшет крышкой и перемешать содержимое планшета встряхиванием на шейкере в течении 1 минуты, после чего инкубировать при температуре 36-37 °С в течение 1 часа.

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

Процедуру промывки повторить еще два раза.

9.8. 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. 9.7., 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.

9.9. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ (**P6**) и инкубировать планшет в течение 3-15 минут в темном месте при комнатной температуре (18-25 °С) в зависимости от степени развития голубого окрашивания.

9.10. Добавить во все лунки по 50 мкл стоп-реагента (**P7**), при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

9.11. Измерить оптическую плотность (ОП) растворов в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм в течении времени не более 5 минут после остановки реакции.

Примечание: при наличии промывочного устройства п. 9.7., 9.8. выполнять с его помощью.

10. Учет результатов.

10.1. Оптическая плотность калибровочной пробы КП_А, содержащей 5000 нг/мл IgG₄, должна быть не менее 1,5.

10.2. Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию IgG₄ в нг/мл, по оси ординат – оптическую плотность при длине волны 450 нм.

10.3. Полученные значения концентрации специфических антител класса IgG₄ к аллергенам в лунках планшетов с сыворотками необходимо интерпретировать согласно таблице 1*.

Таблица 1

Концентрация IgG ₄ в КП, нг/мл	ОП 450 нм	Класс	Интерпретация
5000	1,5-2,3	4	очень высокий уровень
1500	0,9-1,49	3	высокий уровень
500	0,5-0,89	2	средний уровень
150	0,3-0,49	1	низкий уровень
0	0,005-0,29	0	отсутствие сенсибилизации

* - полученные и распечатанные прибором значения концентраций анализируемых проб, рассчитанные по калибровочной кривой, умножить на 10 (фактор разведения проб).

11. Условия хранения и эксплуатации набора.

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

11.2. Срок годности набора - 6 месяцев.

11.3. Вскрытые стрипы хранению не подлежат.

11.4. 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.

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

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

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

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

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

11.10. Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

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

12. Уничтожение и утилизация набора.

12.1. Набор реагентов с истекшим сроком годности подлежит уничтожению.

12.2. Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются вскрытием внутренней упаковки с последующим разведением водой 1:100, сливом раствора в канализацию и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

12.3. Принадлежности, входящие в комплектацию набора, подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственный или бытовой мусор, или сжиганию.

12.4. Персонал, осуществляющий уничтожение изделий, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

13. Транспортирование и хранение набора.

13.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на

данном виде транспорта, при температуре 2-8 °С. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 5 суток.

13.2. Хранение набора в течение всего срока годности должно осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8 °С в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс», по адресу: 355021, Россия, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177Г, стр. 1, тел./факс: +7(8652)28-34-60, e-mail: market@immunotex.ru.

Директор

ООО НПО «Иммунотэкс»

_____ Батурин М.В.