

«УТВЕРЖДАЮ»  
Директор  
ООО НПО «Иммунотэкс»  
\_\_\_\_\_ М.В. Батурин  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2013 г.

## **ИНСТРУКЦИЯ**

### **по применению набора реагентов для количественного иммуноферментного определения общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови человека (IgE-ИФА)**

#### **1. НАЗНАЧЕНИЕ.**

1.1. Набор реагентов IgE-ИФА предназначен для количественного определения содержания общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

1.2. Определяемое количество общего IgE отражает суммарное содержание всех антител класса Е, вырабатываемых к различным экзо- и аутоантигенам.

Показатель уровня общего IgE используется в практике клинико-диагностических лабораторий как диагностический тест и имеет важное значение:

– при дифференциальной диагностике ряда заболеваний атопической природы (ринит, бронхиальная астма, экзема, крапивница, гастроинтестинальная симптоматика у детей, бронхолегочный аспергиллез);

– при диагностике и лечении паразитарных инвазий, грибковых, бактериальных, вирусных инфекций, иммунодефицитных состояний;

– при определении наследственной предрасположенности к развитию аллергии с целью прогнозирования аллергии новорожденных и проведения соответствующих профилактических мер.

#### **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.**

2.1. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 82 неизвестных проб (всего 192 определения, включая калибровочные пробы и контрольную сыворотку).

#### **2.2. Принцип метода.**

В наборе использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Анализ основан на использовании моноклональных антител (МКАТ), направленных к двум разным антигенным участкам молекулы IgE человека. Одно из МКАТ служит для сенсibilизации поверхности планшетов и обеспечивает связывание на твердой фазе IgE из анализируемых проб. Второе МКАТ, меченное ферментом (пероксидазой хрена), взаимодействует со второй антигенной детерминантой связанных на твердой фазе молекул IgE. Не связавшиеся компоненты анализируемых проб, а также избыток меченных МКАТ удаляют с твердой фазы повторными отмываниями. Активность пероксидазы на твердой фазе определяют по разложению

субстрата - перекиси водорода. Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (тетраметилбензидина - ТМБ) в окрашенное производное, количество которого пропорционально ферментативной активности.

Результаты анализа регистрируют с помощью фотометра вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Концентрацию IgE в пробах определяют по калибровочному графику, построенному на основании зависимости оптической плотности измерения от концентраций IgE в калибровочных пробах.

### 2.3. Состав набора.

**Таблица 1**

#### Характеристика компонентов

№ п/п	Шифр	Наименование компонента	Количество	Способ применения
1	P1	Полистироловый 96-луночный наборный планшет с иммобилизованными МКАТ анти-IgE	2 планшета (24 стрипа)	Вскрыть стрипы и необходимое количество поместить в рамку-держатель.
2	P2/А	Калибровочная проба 0 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
3	P2/Б	Калибровочная проба 5 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
4	P2/В	Калибровочная проба 20 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
5	P2/Г	Калибровочная проба 110 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
6	P2/Д	Калибровочная проба 350 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
7	P2/Е	Калибровочная проба 560 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению.
8	P3	Контрольная сыворотка с известным содержанием IgE	1 пробирка (0,25 мл)	Готова к употреблению.
9	P4	Конъюгат МКАТ анти-IgE с пероксидазой (100-кратный концентрат)	1 пробирка (0,25 мл)	Развести в 100 раз промывающим раствором. Рабочий раствор конъюгата хранить не более 2 дней при температуре от +2 °С до +8 °С.
10	P5	Промывающий раствор (трис-буфер, 10-кратный концентрат)	1 флакон (30 мл)	Развести в 10 раз дистиллированной водой. К одному объему P5 добавить 9 объемов дистиллированной воды. Готовый раствор хранить не более 10 дней при температуре от +2 °С до +8 °С.

продолжение таблицы 1

№ п/п	Шифр	Наименование компонента	Количество	Способ применения
11	P6	Хромоген (ТМБ)	1 флакон (22 мл)	Готов к употреблению
12	P7	Стоп-реагент (1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 флакон (12 мл)	Готов к употреблению
13		Калибровочный график	1 шт.	
14		Трафарет для анализа	1 шт.	

Концентрация IgE в калибровочных пробах и контрольной сыворотке может незначительно изменяться от серии к серии: точное значение указано на этикетках пробирок.

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

3.1. Специфичность: не выявлено перекрестной реакции моноклональных антител против IgE с иммуноглобулинами A, G, M.

3.2. Чувствительность: минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgE в сыворотке крови человека не превышает 2,5 кЕ/л.

3.3. Коэффициент вариации (КВ): результаты измерения содержания IgE в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора не превышает 8%.

3.4. Диапазон определяемых концентраций IgE: 5-560 кЕ/л.

Таблица 2

#### Возрастные нормы концентрации IgE в сыворотке крови человека:

Возраст	Концентрации IgE(кЕ/л)
новорожденные	0-2
3-6 месяцев	от 3 до 8
от 6 месяцев до 1 года	до 10
от 1 до 5 лет	до 20
от 5 до 10 лет	до 50
от 10 до 16 лет	до 60
старше 16 лет и взрослые	до 100

### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях 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.

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

4.4. При работе с набором следует соблюдать основные правила работы в КДЛ согласно «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Минздрава СССР», 1981 года.

## **5. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ:**

- фотометр вертикального сканирования для 96-луночных планшетов, позволяющий производить измерение оптической плотности при длине волны 450 нм;
- пипетки полуавтоматические, варьирующие, со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объем 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  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- холодильник бытовой;
- штатив;
- мерные колбы, цилиндры, мензурки вместимостью 25, 100, 250, 500 мл;
- центрифужные пробирки вместимостью 10 мл;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые.

## **6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.**

6.1 Материалом для исследований служат негемолизированные прозрачные образцы сыворотки крови человека. Забор крови для получения сыворотки осуществляют в процедурном кабинете с соблюдением установленных правил предосторожности, чтобы исключить возможность заражения ВИЧ-инфекцией и вирусом гепатита В. Образцы крови (сыворотки) должны доставляться в контейнерах или в пробирках, герметично закрытых пробками.

Пробирки с кровью помещают на 1 час в термостат при температуре  $(36\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C})$ , а затем в холодильник при температуре от  $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 16-18 часов. Образовавшиеся при этом сгустки отделяют от стенок стеклянной палочкой. Сыворотку сливают со сгустков в центрифужную пробирку и центрифугируют при 1500-2000 об/мин в течение 20-30 мин. Если тестирование проводится не сразу, то пробы сыворотки можно хранить в течение 2 дней при температуре от  $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  или 5 месяцев при температуре от  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Замораживать только 1 раз. Повторное замораживание не допускается.

## **7. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ.**

7.1. Перед работой извлечь набор из холодильника и выдержать его при комнатной температуре 30 минут. Перед использованием реагенты тщательно перемешать.

- 7.2. Приготовить рабочие растворы так, как указано в разделе 2 (таблица 1).
- 7.3. Поместить в рамку-держатель необходимое количество стрипов.
- 7.4. Составить схему расположения анализируемых образцов на прилагаемом трафарете.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

- 8.1. Анализы следует проводить в дублях.
- 8.2. При отборе проб необходимо использовать одноразовые наконечники.
- 8.3. Время внесения проб в лунки одного планшета не должно превышать 15 минут, время инкубации необходимо исчислять от момента внесения реагента в последнюю лунку. Если анализы проводят на двух планшетах, то каждый планшет должен включать анализ калибровочных проб.
- 8.4. Пробы вносить в соответствии со схемой расположения на трафарете.
- 8.5. Компоненты набора вносить в лунки по стадиям в следующем порядке:

**Таблица 3**

### 8.5.1. Иммунологическая стадия I этап

Вносимые компоненты	Лунки, покрытые иммобилизованными анти-IgE (P1)		
	P2/A-E	P3	НП
Промывающий раствор P5	90 мкл	90 мкл	90 мкл
Калибровочные пробы P2/A-E - «0», «5», «20», «110», «350», «560»	10 мкл		
Контрольная сыворотка P3		10 мкл	
Неизвестная исследуемая проба (НП)			10 мкл

8.5.2. Во все лунки планшета внести по 90 мкл промывающего раствора, затем внести по 10 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки в дубликатах. В остальные лунки внести по 10 мкл неизвестных исследуемых проб.

8.5.3. После внесения компонентов планшет накрыть крышкой и перемешать в ячейках на шейкере 1 минуту, либо путем осторожных покачиваний вручную.

8.5.4. Инкубировать 1 час при температуре 37 °С в термостате.

8.5.5. Отмывка:

- удалить жидкость из лунок путем стряхивания из перевернутого планшета;
- немедленно заполнить лунки промывающим раствором по 150 мкл;
- через минуту удалить жидкость путем стряхивания.

Процедуру повторить еще два раза.

Таблица 4

8.5.6. **Иммунологическая стадия II этап**

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти-IgE (P1)		
	P2/A-E	P3	НП
Конъюгат МКАТ анти-IgE (P4)	100 мкл	100 мкл	100 мкл

8.5.7. Внести рабочий раствор конъюгата МКАТ по 100 мкл во все лунки.

8.5.8. Инкубировать планшеты 1 час при температуре 37 °С. Удалить жидкость из лунок.

8.5.9. Отмывка. Так же, как в п. 8.5.5. Процедуру отмывки проводить 3 раза. Затем дважды лунки стрипов промыть дистиллированной водой.

Удалить следы раствора путем стряхивания.

Таблица 5

8.5.10. **Ферментативная стадия**

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти-IgE (P1)		
	P2/A-E	P3	НП
ТМБ (P6)	100 мкл	100 мкл	100 мкл

8.5.11. Внести ТМБ (P6) по 100 мкл в каждую лунку планшета.

8.5.12. Инкубировать планшет 5-15 минут в темном месте, периодически перемешивая. Ферментативная реакция дает голубое окрашивание.

Таблица 6

8.5.13. **Остановка реакции**

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти-IgE (P1)		
	P2/A-E	P3	НП
Стоп-реагент 1 N раствор H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (P7)	50 мкл	50 мкл	50 мкл

8.5.14. Внести стоп-реагент по 50 мкл в каждую лунку планшета. Содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

8.5.15. Измерить оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм сразу после остановки реакции.

Некоторые фотометры (например Мультискан МСС340, Лабсистем, Финляндия) могут автоматически вычислять концентрацию IgE (кЕ/л) в анализируемых образцах методом линейной интерполяции, при этом необходимо предварительно составить программу (см. инструкцию к фотометру) для автоматического построения калибровочной кривой.

**9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.**

9.1. Найти среднее арифметическое значение ОП для каждой пары калибровочных проб,

контрольной сыворотки и исследуемых образцов.

9.2. ОП в лунках с калибровочной пробой 0 кЕ/л должна быть не более 0,2.

9.3. ОП в лунках с калибровочной пробой 560 кЕ/л должна быть не менее 1,5.

9.4. Построить калибровочную кривую на прилагаемом калибровочном графике.

9.5. На калибровочном графике найти значения концентраций, соответствующих значениям ОП исследуемых сывороток, и получить результат в кЕ/л.

9.6. Если ОП исследуемой сыворотки выше значения ОП для калибратора 560 кЕ/л, следует развести сыворотку и повторить анализ. В этом случае значение концентрации, полученное по калибровочному графику, следует умножить на коэффициент дополнительного разведения - 5, 10, 100.

9.7. Проверить по известным значениям концентрации IgE для контрольной сыворотки правильность проведения анализа. Если полученное значение находится в пределах, указанных на этикетке, то результат анализа считать правильным.

Общее время проведения анализа 3 часа.

## **10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ 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 °С не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Транспортирование наборов должно производиться при температуре 2-8 °С всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25 °С не более 5 суток.

10.3. Срок годности набора - 6 месяцев.

10.4. Вскрытые стрипы хранению не подлежат.

10.5. 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.

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

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

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

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

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

10 дней.

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

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

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

По вопросам, касающимся качества набора IgE-ИФА, следует обращаться в ООО НПО «Иммунотэкс» по адресу: 355021, г. Ставрополь, ул. Доваторцев, 177Г, стр. 1, тел./факс +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.

## **11. УНИЧТОЖЕНИЕ И УТИЛИЗАЦИЯ.**

11.1. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит и подвергается уничтожению.

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

11.3. Уничтожение контрольных сывороток производится путем их обеззараживания 6% раствором перекиси водорода или автоклавированием при температуре 120 °С в течение 30 минут.

11.4. Технические приспособления, принадлежности, входящие в комплектацию набора, подлежат механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора или сжиганию.

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