

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения и
социального развития

Р.У. Хабишев
«30» 06 2006 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов для иммуноферментного определения

концентрации общего иммуноглобулина класса Е

в сыворотке крови

(IgE общий – ИФА – БЕСТ)

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом по медицинским изделиям

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов IgE общий – ИФА – БЕСТ предназначен для количественного определения концентрации общего иммуноглобулина класса Е в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Общий иммуноглобулин класса Е (IgE_{общ}) – класс иммуноглобулинов, имеет молекулярную массу 190000 Да. Содержание IgE_{общ} в сыворотке крови в норме крайне мало. Концентрация IgE_{общ} в сыворотке крови постепенно возрастает с момента рождения человека до подросткового возраста. У взрослых некурящих людей концентрация IgE_{общ} в норме может достигать 100 МЕ/мл. В пожилом возрасте уровень IgE_{общ} обычно снижается.

1.3. Количественное определение содержания IgE_{общ} в сыворотке крови является важным вспомогательным средством, позволяющим дифференцировать аллергические заболевания среди множества патологий, клинически проявляющихся как астма, частые заболевания дыхательных путей, хронические риниты и дерматиты. Повышенные концентрации IgE_{общ} в сыворотке крови, помимо аллергических заболеваний, отмечается при аскаридозе, лимфосаркоме и гипер-IgE_{общ}-синдроме.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестного образца, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки при одновременном использовании всех стрипов планшета (всего 96 определений).

Инструкция составлена: сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест» зам. директора НИИ СД
М.Ю. Рукавишниковым и зав. лабораторией С.С. Решетниковым.

27.07.06.
Боро-Бородухина

Синица
09.06.06 г.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на твердофазном иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител. В лунках, при добавлении исследуемого образца, во время первой инкубации происходит связывание молекулы $IgE_{общ}$ с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок. Во время второй инкубации конъюгат моноклональных антител к $IgE_{общ}$ человека с пероксидазой связывается с $IgE_{общ}$, иммобилизованным в ходе первой инкубации. Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации $IgE_{общ}$ в анализируемых пробах.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация $IgE_{общ}$ в анализируемых образцах.

3. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к $IgE_{общ}$, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, аттестованные по Второму международному стандарту WHO 75/502 на общий IgE человека, содержащие известные количества $IgE_{общ}$ – 0; 5; 25; 110; 315; 800 МЕ/мл; концентрации $IgE_{общ}$ в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 6 пробирок (по 120 мкл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием $IgE_{общ}$, готовая для использования – 1 пробирка (120 мкл);
- конъюгат моноклональных антител к $IgE_{общ}$ с пероксидазой хрена, концентрат – 1 пробирка (150 мкл);
- раствор для разведения сывороток – 2 флакона (по 13 мл);
- раствор для разведения конъюгата – 1 флакон (13 мл);
- промывочный раствор, концентрат – 1 флакон (28 мл);
- раствор для разведения тетраметилбензидина – 1 флакон (13 мл);
- тетраметилбензидин, концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (1 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт;

- ванночка для реагента – 2 шт;
- наконечники для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрёстной реакции используемых в наборе моноклональных антител к IgE с иммуноглобулинами классов G, M, A.

4.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgE_{общ} в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора IgE общий -ИФА-БЕСТ не превышает 8%.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации IgE_{общ} в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей IgE_{общ}, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5-800 МЕ/мл и составляет $\pm 10\%$.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации IgE_{общ} предписанной в пробе, полученной путём смешивания равных объёмов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgE_{общ} не превышает 2,5 МЕ/мл.

4.6. Клиническая проверка. Концентрацию IgE_{общ} измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 107 здоровых лиц юго-восточного региона Западной Сибири в возрасте 20-50 лет. Средняя концентрация IgE_{общ} составила 88 МЕ/мл (11-165 МЕ/мл).

4.7. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации IgE_{общ}, соответствующие нормальным, у обследуемого контингента людей.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б.

5.2. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента (раствор серной кислоты), являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

5.3. 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.).

5.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

5.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм;

– термостат, поддерживающий температуру $+37\pm 1^{\circ}\text{C}$;

– микроцентрифуга, позволяющая центрифугировать при 1500-2000 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости от 15 до 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 15, 100 и 250 мкл;

- насос водоструйный;
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 100 мл;
- колба вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при комнатной температуре (+18–25 °C) в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка, установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов и использовать их в течение времени не более 1 ч. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и хранить при температуре +2–8 °C в течение всего срока годности.

7.3. Подготовка калибровочных проб и контрольной сыворотки

Пробирки с калибровочными пробами и контрольной сывороткой центрифугировать на микроцентрифуге при 1500-2000 об/мин в течение 5 сек при комнатной температуре. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать пипетированием, избегая образования пены.

После отбора части содержимого тщательно закупоренные пробирки хранить при температуре +2–8 °C не более 1 мес.

7.4. Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора перенести в колбу вместимостью 1000 мл, добавить 672 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре +30–40 °C до полного растворения осадка.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре +2–8 °C не более 4 недель.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания первой инкубации! Использовать в течение 1 ч после приготовления.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина.

Готовится в стеклянном флаконе за 5-10 мин до окончания второй инкубации! Использовать в течение 20 мин после приготовления.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во исполь- зуемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина	
	Концентрат конъюгата, мкл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметил- бензидина, мкл	Раствор для разведения тетраметил- бензидина, мл
2	20	2,0	100	2,0
3	30	3,0	150	3,0
4	40	4,0	200	4,0
5	50	5,0	250	5,0
6	60	6,0	300	6,0
7	70	7,0	350	7,0
8	80	8,0	400	8,0
9	90	9,0	450	9,0
10	100	10,0	500	10,0
11	110	11,0	550	11,0
12	120	12,0	600	12,0

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Во все лунки внести по 200 мкл раствора для разведения сывороток.

8.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 15 мкл каждой калибровочной пробы, 15 мкл контрольной сыворотки и по 15 мкл анализируемых образцов сыворотки крови. Сразу после внесения образцов содержимое лунок немедленно перемешать пипетированием.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 15-20 мин.

8.3. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37\pm 1$ °C.

8.4. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием или декантированием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.4), с последующим отсасыванием или декантированием. Процесс промывки повторить 5 раз. После каждой промывки следует тщательно удалять остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

8.5. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (см п. 7.5), заклеить планшет пленкой и инкубировать в течение 30 мин при температуре $+37\pm 1$ °C.

8.6. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и промыть планшет 6 раз рабочим промывочным раствором так, как это указано в п. 8.4.

8.7. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 10–15 мин (в зависимости от степени развития окрашивания) при комнатной температуре (+18- 25 °С).

8.8. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8.9. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на спектрофотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить через 2-3 мин после остановки реакции.

Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 20 мин.

8.10. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от концентрации $IgE_{общ}$ в калибровочных пробах (МЕ/мл).

8.11. Определить содержание $IgE_{общ}$ в контрольной сыворотке и анализируемых пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения анализируемых образцов необходимо полученную концентрацию $IgE_{общ}$ умножить на фактор разведения.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

9.1. Набор реагентов IgE общий–ИФА–БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (6 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 3 сут.

Замораживание набора не допускается.

9.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре +2–8 °С в течение всего срока годности;

– калибровочные пробы, контрольную сыворотку, раствор для разведения сывороток, концентрат конъюгата и концентрат тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес;

– раствор для разведения конъюгата, раствор для разведения тетраметилбензидина и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;

– рабочий раствор конъюгата можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 1 ч;

– рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 4 недель;

– рабочий раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 20 мин;

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации $\text{IgE}_{\text{общ}}$ в контрольной сыворотке.

9.3. Для представления результатов измерений концентрации иммуноглобулина Е в нг/мл, использовать коэффициент пересчета 2,4 ($1 \text{ ME/мл IgE}_{\text{общ}} = 2,4 \text{ нг/мл IgE}_{\text{общ}}$).

9.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

9.5. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 24 ч или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

9.6. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре.

9.7. Если концентрация $\text{IgE}_{\text{общ}}$ в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 800 ME/мл, образец следует развести раствором для разведения сывороток в 10 раз (10 мкл исследуемого образца + 90 мкл раствора для разведения сывороток), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

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

9.9. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора IgE общий-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46, 332-37-58, тел./факс (383), 336-60-30, 332-67-52,

и в **Институт контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу:

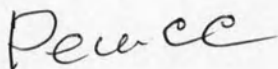
117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (095) 120-60-95; 120-60-96.

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест»



С.С. Решетников