

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения общих IgE антител
(RIDASCREEN® Total IgE)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Total IgE

Иммуноферментный тест для определения суммарного IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 96 определений**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

RIDASCREEN® Total IgE является диагностическим тестом для количественного определения *in vitro* суммарных антител IgE в сыворотке крови человека. Этот тест должен использоваться в комбинации с тестом на специфические IgE в целях диагностики atopических заболеваний.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации – при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям I типа предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии.

Данный метод используется для измерения возрастающих концентраций общего IgE в случае сенсибилизации организма или аллергии. Самый высокий уровень IgE регистрируется при atopических дерматитах и может достигать 20000 МЕ/мл.

Возрастающие концентрации IgE могут быть обусловлены также другими заболеваниями, ассоциированными с паразитами или инфекциями, такими как микоплазмы, коклюш, ВИЧ или злокачественная миелома и даже некоторые иммунодефицитные состояния. Однако низкие концентрации общего IgE не исключают наличия аллергической реакции.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Total IgE основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Антитела к IgE человека нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Антитела IgE, содержащиеся в стандартах, контролях и исследуемых образцах, связываются с этими антителами. На второй стадии добавляется конъюгат антител к IgE-антителам человека с щелочной фосфатазой. На третьей стадии добавляется субстрат, который дефосфорилируется щелочной фосфатазой. В результате происходит изменение окраски с бесцветной на желтую. Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм. Интенсивность окрашивания раствора прямо пропорциональна количеству IgE-антител в сыворотке. Результаты выражаются в МЕ/мл.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет в рамке-держателе, состоящий из двенадцати отделяемых 8-луночных стрипов; покрытые антителами к IgE человека	96 опред.
AllergyPP	Буфер для разведения образцов: содержит 0,1% NaN ₃ ; крышка белого цвета; готов к использованию	1 x 15 мл
AllergyWP	Промывочный буфер: 16x концентрат; содержит 1% NaN ₃ ; крышка коричневого цвета	1 x 60 мл
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgE; 0 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgE; 5 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgE; 25 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgE; 100 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 5	Стандартная сыворотка 5: раствор сыворотки человека с IgE; 250 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 6	Стандартная сыворотка 6: раствор сыворотки человека с IgE; 500 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Standard 7	Стандартная сыворотка 7: раствор сыворотки человека с IgE; 1000 ME IgE/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 225 мкл
Control high	Положительный контроль IgE с высокой концентрацией: раствор сыворотки человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая зеленая крышка; готов к использованию;	1 x 125 мкл
Control low	Положительный контроль IgE с низкой концентрацией: раствор сыворотки человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая желтая крышка; готов к использованию	1 x 125 мкл
Conjugate	Конъюгат антител кролика к IgE человека: конъюгат антител с щелочной фосфатазой; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; крышка красного цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
AllergySub	Субстратный раствор: p-нитрофенил-фосфат (PNPP) в диэтаноламине; крышка черного цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
AllergyStop	Стоп-реагент: 0,2 N NaOH; 7% ЭДТА; крышка зеленого цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Пакет из алюминиевой фольги необходимо открывать с помощью ножниц, не повреждая застёжку. Неиспользованные стрипы сразу же положите обратно в пакет из фольги, запечатайте пакет и храните его при 2-8 °C.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. Контроль качества.

6. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм)
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Термостат (инкубатор) для 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, высокий и низкий контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако, контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Стандартная сыворотка, конъюгат и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктеричных, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	10 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного

времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

После размещения требуемого количества лунок в рамке планшета внесите по 20 мкл стандартов 1-7 (в дубликатах), контролей и исследуемых образцов. После этого внесите в каждую лунку по 100 мкл буфера для образцов **AllergyPP** и хорошо перемешайте. Закройте планшет и инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут в закрытом инкубаторе (рекомендуется).

9.4. Промывание

Планшет промойте 6 раз, заполняя лунки по 250-300 мкл (в случае промывки ручной промывочной системой) или по 300 мкл промывочного буфера в режиме «Overflow» (в случае автоматической промывки) и затем отсасывая жидкость в контейнер для жидких отходов с дезинфицирующим раствором. Использование пипетки для промывания микропланшета не подходит. Последнюю порцию промывочного буфера удалите полностью, резко постукивая перевернутым планшетом по впитывающей бумаге. При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следует обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу планшета.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждую лунку по 100 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C.

9.6. Промывание

Промойте планшет 6 раз, как описано в п. 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора в каждую лунку. Закройте планшет и инкубируйте в течение 15 минут при 37 °C в темноте. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Измерение оптической плотности должно выполняться при 405 нм против референтной длины волны 620 нм. Измерения можно проводить в течение 24 часов после остановки реакции, если планшет был закрыт и находился в холодном месте.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – показатель нестабильности или непригодности реагентов

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-7 (в дубликатах), а также положительный высокий и низкий контроли. Тест считается проведенным правильно, если полученная концентрация контролей соответствует интервалу, указанному на этикетке.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- правильность хранения реагентов
- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел голубую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Результаты, полученные с сыворотками пациентов

11.1.1. Основы расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось *x* / линейная ось *y*) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (МЕ/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgE-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Калибраторы в наборе RIDASCREEN® Specific IgE аттестованы по 2-му Международному Стандарту ВОЗ IRP75/502 для человеческого IgE.

11.2. Расчет результатов

В приведенной таблице указаны значения концентрации общего IgE в зависимости от возрастной группы.

Таблица 3. Стандартные значения концентрации антител IgE в зависимости от возраста.

Новорожденные	< 2
1 год	40
2 года	100
3 года	150
5 лет	190
6 лет	150
старше 16 лет	120

Представленные значения являются ориентировочными. Более точные данные недоступны, так как границы интервалов для аллергических и неаллергических состояний могут сильно перекрываться.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение концентрации суммарного IgE – хороший диагностический инструмент, помогающий, главным образом, в выявлении пациентов с предполагаемой или подтвержденной аллергией.

Из-за больших колебаний концентрации суммарного IgE у различных индивидуумов (например, у "нормальных" здоровых и у людей, страдающих атопией) определение "нормального" интервала значений не вполне выполнимо.

"Нормальные" значения концентрации суммарного IgE не исключают наличие аллергического заболевания, у людей, страдающих атопическими заболеваниями, уровень IgE может быть сильно повышен. С другой стороны, могут быть выявлены нормальные концентрации IgE при аллергиях, характеризующихся исключительно поражением органов дыхания. Следующая таблица поможет ориентироваться в клиническом значении различных уровней IgE у взрослых:

20 МЕ/мл	Аллергия маловероятна, но возможна
20 - 100 МЕ/мл	Диагностически "интервал неопределенных значений"; аллергия возможна
> 100 МЕ/мл	Вероятна аллергическая реакция, возможна атопия

Уровень суммарного IgE в сыворотке у детей и подростков напрямую зависит от возраста. Обычно в пуповинной крови у новорожденных обнаруживается менее 1 МЕ/мл суммарного IgE. К трехлетнему возрасту эта величина возрастает до 10 МЕ/мл, а к 16 годам – до 20-50 МЕ/мл.

Исследования показали, что у новорожденных с уровнем IgE в пуповинной крови, превышающем 1,3 МЕ/мл, шанс развития атопии до 18-месячного возраста составляет 70%, до возраста 4,5 года - 80%. Таким образом, определение суммарного IgE в крови пуповины новорожденных может оказаться весьма важным для прогноза развития атопий.

- экзема
- крапивница
- дерматиты
- паразитарные инфекции
- вирусные инфекции
- инфекционный мононуклеоз
- иммунодефицит
- злокачественность
- синдром Вискотта-Олдрича
- миелома.

Образец	4484	4525	4478	4486	4571
Концентрация в МЕ/мл	3,5	20,6	77,7	162,3	1092,3
Кол-во тестов	8x3	8x3	8x3	8x3	8x3
Коэффициент вариации	31.6	26.2	6.6	5.9	23.1

Образец	4484	4530	4478	4486	4528
Концентрация в МЕ/мл	6,3	16,3	78,5	150,4	470,1
Кол-во тестов	32	32	32	32	32
Коэффициент вариации	11,7	8,2	8,2	9,7	12,5

К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 листов.



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа
ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения специфических IgE/IgG-антител
(RIDASCREEN® Allergen Discs)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Allergen Discs

Иммуноферментный тест для определения специфических IgE в сыворотке крови человека.

Аллергодиски

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® Allergen Discs является диагностическим тестом для количественного определения *in vitro* аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови человека. Используется для подтверждения диагноза при подозрении на аллергию по клинической картине или результатам диагностики *in vivo*.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии.

В случае проявления аллергической реакции возможно определение аллергического агента, ставшего причиной реакции, путем обнаружения специфических антител класса IgE в сыворотке крови. Этот метод также можно использовать для определения бессимптомной сенсибилизации.

RIDASCREEN® Allergen Discs тест основан на проведении ИФА на нитроцеллюлозных дисках, на которые нанесены аллергены.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Allergen Discs основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аллергены нанесены на нитроцеллюлозные диски, помещенные в лунки стрипов. Исследуемая сыворотка, стандартная сыворотка и положительный и отрицательный контроли вносят в лунки с дисками и инкубируют при 37 °C. В процессе инкубации присутствующие в образцах IgE-антитела, специфичные к определенному аллергену, связываются с иммобилизованным аллергеном, образуя комплекс антиген-антитело. IgE-антитела, не специфичные к данному аллергену, остаются несвязанными и удаляются на стадии промывки. На второй стадии добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки.

Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

Некоторые аллергены нанесены на целлюлозные диски в присутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA). Для таких аллергенов следует использовать дополнительный диск с сорбированным HSA,

чтобы учесть поправку на неспецифическое связывание с HSA на аллергодиске. В каталоге такие аллергенные диски имеют маркировку "- HSA".

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Plate	Восьмилуночные стрипы, разделяемые на отдельные лунки; содержат нитроцеллюлозные диски с сорбированным аллергеном (1 шт.) и раствор NaCl (0,9%) с NaN ₃ (0,1%) (1 x 0,05 мл)	3 x 8
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

6. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП.
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Термостат (инкубатор) для 37 °С
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, положительный и отрицательный контроли) наборов RIDASCREEN®, используемые для анализа с данным тестом, показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности. Стандартная сыворотка, конъюгат и концентрат промывочного буфера из наборов RIDASCREEN® содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Стоп-реагент содержит 0,2 М гидроксида натрия и 7% ЭДТА, поэтому может оказывать раздражающее воздействие. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой. В случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством мыла и воды. При попадании в глаза немедленно промойте под проточной водой в течение 15 минут с открытым веком. Проконсультироваться с врачом. В случае проглатывания выпить большое количество воды, избегая рвоты, и вызвать врача.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121 °С не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогревания концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Размещение аллергодисков по лункам планшета

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, **DiscA**, вложенными в лунки согласно протоколу покупателя. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, в дополнение к дискам с аллергенами, вложен **один HSA-диск**.

В случае поступления набора с отдельными рамками, аллергенные диски поставляются вложенными в лунки стрипов. Лунки, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете, отламывают от стрипа и вставляют в рамку планшета. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, вставляется **одна лунка с HSA-диском** в дополнение к лункам с аллергенами.

9.4. Первая инкубация

Буфер, находящийся в лунках, необходимо полностью удалить. После этого в соответствующие лунки внесите по 50 мкл калибраторов (в дубликатах), положительного или отрицательного контроля, а также сывороток пациентов. Закройте планшет и инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов (рекомендуется) следует каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Следует обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз весь объем лунки промывочным буфером максимально и инкубируйте 10 минут с буфером после второй и четвертой стадий промывки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струи жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата Conjugate. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °С.

9.7. Промывка

Промойте планшет, как описано в п. 9.5.

9.8. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируйте в течение 15 минут при 37 °С. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Измерение оптической плотности должно выполняться через диски, лежащие в лунках, при 405 нм (или 410 нм) против референсной длины волны 620 нм (или 630 нм).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °С).
2. Разведите концентрат промывочного буфера.
3. Опорожните лунки отсасыванием жидкости.
4. Внесите в лунки по 50 мкл калибраторов, положительного контроля, отрицательного контроля или исследуемых образцов сыворотки пациентов; инкубируйте в течение 60 минут при 37 °С.
5. Промойте лунки 6 раз, внося по 700 мкл промывочного буфера (автоматическая промывка) или максимально вмещающийся объем буфера (промывка вручную) в каждую лунку; при использовании ручного промывочного устройства инкубируйте промывочный раствор в лунках в течение 10 минут после второй и четвертой стадий промывки; затем удалите жидкость из лунок.
6. Внесите в лунки по 50 мкл конъюгата и инкубируйте в течение 60 минут при 37 °С.
7. Промойте планшет, как в п. 5.
8. Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора; инкубируйте в течение 15 минут при 37 °С; остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента.
9. Измерьте оптическую плотность через диски при 405 нм (410) против референсной длины волны 620 нм (630).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – показатель нестабильности или непригодности реагентов

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-5 (в дубликатах), а также положительный и отрицательный контроли. Тест считается проведенным правильно, если ОП_{405/620} для стандарта 5 больше 1.0 и полученный для контролей EAST-класс соответствует интервалу, указанному на этикетке.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- правильность хранения реагентов
- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки и рассчитанные для них EAST-классы протоколировать.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Результаты, полученные с сыворотками пациентов

11.1.1. Основы расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полупрозрачную бумагу (логарифмическая ось *x* / линейная ось *y*) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (МЕ/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgE-антител в образце по величине измеренной оптической

плотности. Затем эти данные можно интерпретировать по EAST с помощью таблицы 1. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Калибраторы в наборе RIDASCREEN® (кат. № A004006) аттестованы по 2-му Международному Стандарту ВОЗ IRP75/502 для человеческого IgE.

11.1.2. Концентрации, EAST-классы и оценки

Таблица 1. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка содержания аллерген-специфического IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	нижний порог
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	слегка увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	очень высокое
≥ 100,00 *	6 (≥ 6,0) *	чрезвычайно высокое *

* определяется способом линейной экстраполяции, так как в тесте используются только 5 калибраторов.

11.1.3. Интерпретация результатов с использованием аллергенов, связанных с HSA, и HSA-дисков

Некоторые аллергены, такие как металлы, различные химические соединения и лекарственные вещества, а также ряд пищевых добавок сорбированы на целлюлозные диски в виде комплексов с HSA (человеческим сывороточным альбумином). Для того, чтобы учесть эффект неспецифического связывания антител с HSA, сыворотки пациентов проверяют как на диске, покрытом специфическим аллергеном в комплексе с HSA, так и на диске, покрытом одним HSA. Рассчитывают частное (Q) от деления величины ОП в лунке с аллерген-HSA-диском на ОП в лунке с HSA-диском по следующей формуле:

$$Q = \frac{\text{ОП (аллерген-HSA)}}{\text{ОП (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.1.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками

Таблица 2. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента аллерген-специфических IgE при использовании мультиаллергенных дисков.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка
0 – 0,34	0	отрицательный
≥ 0,35	≥ 1	положительный

В случае положительного результата тест следует повторить с индивидуальными аллергенными дисками.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подсчитанные концентрации IgE-антител позволяют сделать заключение о сенсибилизации пациентов относительно отдельных аллергенов или смесей аллергенов.

Не установлено прямой связи между концентрацией IgE-антител и ее клиническим значением. Поэтому результаты анализа всегда должны интерпретироваться с учетом полного клинического диагноза пациента.

Ввиду отсутствия национального и международного стандарта, а также по причине различий в технологии получения экстрактов аллергенов, могут наблюдаться различия в результатах исследований *in vivo* и *in vitro*. Измерение титра IgE-антител сразу после проявления анафилактической реакции может дать ложноотрицательные или заниженные результаты. В случае обнаружения различий в результатах исследований *in vivo* и *in vitro* тест следует повторить через 3-4 недели. Повторяющиеся несоответствия результатов анализа должны быть исследованы аллергологом с применением тестов *in vivo*, таких как провокационные тесты. Необходимо помнить, что провокационные тесты могут вызвать анафилактический шок.

Положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить потерю некоторых эпитопов отдельных аллергенов в процессе их производства, вследствие чего возможны ложноотрицательные результаты.

Показан текущий контроль за концентрацией специфического IgE при проведении гипосенсибилизации или удалении аллергенов. Хорошим дополнением к определению IgE может служить параллельное определение титров специфических IgG (набором RIDASCREEN® Spezifisches IgG, кат. № A0629), в особенности, в случаях пищевой и дыхательной аллергии, таких как «легкие любителя птиц» и «астма пекаря».

13. ДАННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТЕСТА

13.1. Вариабельность результатов в разных исследованиях

Таблица 3. Сводные данные экспериментов по вариабельности в разных исследованиях; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В разных исследованиях	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F37 F4, F85, K82
Число исследований на аллерген	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов
Арифметическое среднее C.V.	11,7 %	3,44 %	3,65 %

13.2. Вариабельность внутри одного исследования

Таблица 4. Сводные данные экспериментов по вариабельности внутри одного исследования; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В одном исследовании	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6, F2, F37, F4, F17, K82	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F27, F4, F85, K82
Число повторов на аллерген	32	32	32
Арифметическое среднее C.V.	12,69 %	3,86 %	3,88 %

13.3. Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора была определена с использованием стандартного материала, калиброванного по стандарту ВОЗ; и составила 0,24 МЕ/мл.

Аналитическая чувствительность определялась по средним значениям последовательных разведений стандартной сыворотки.

Использованный критерий: Разница измеренных значений ОПср.₄₀₅₋₆₂₀ разведения сыворотки, соответствующего концентрации в ней IgE-антител к определенному аллергену 0,229 МЕ/мл, и предыдущего, т. е. меньшего разведения, составляет 2SD (2 величины стандартного отклонения, при доверительном уровне 95 %).

Диагностическая чувствительность составляет менее, чем 0,35 МЕ/мл.

13.4. Специфичность

Выборку аллергенов из 11 различных групп аллергенов тестировали на различных образцах сыворотки; полученные данные сравнивали с результатами анализа с использованием тест-систем других производителей и наборов для *in vitro* диагностики. Специфичность составила 91,2 %.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Всего пронумеровано,
пронумеровано и скреплено
печатью 6 ЛИСТОВ.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител
(RIDASCREEN® Spezifisches IgE)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Spezifisches IgE

Иммуноферментный тест для определения специфических IgE в сыворотке крови человека.

аллергодиски и реагенты (полный набор на 96 определений)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® Spezifisches IgE является диагностическим тестом для количественного определения *in vitro* аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови человека. Используется для подтверждения диагноза при подозрении на аллергию по клинической картине или результатам диагностики *in vivo*.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии.

В случае проявления аллергической реакции возможно определение аллергического агента, ставшего причиной реакции, путем обнаружения специфических антител класса IgE в сыворотке крови. Этот метод также можно использовать для определения бессимптомной сенсibilизации.

RIDASCREEN® Spezifisches IgE тест основан на проведении ИФА на целлюлозных дисках, на которые нанесены аллергены.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Spezifisches IgE основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аллергены нанесены на целлюлозные диски, помещенные в лунки стрипов или микропланшета. Исследуемая сыворотка, стандартная сыворотка и положительный и отрицательный контроли вносят в лунки с дисками и инкубируют при 37 °C. В процессе инкубации присутствующие в образцах IgE-антитела, специфичные к определенному аллергену, связываются с иммобилизованным аллергеном, образуя комплекс антиген-антитело. IgE-антитела, не специфичные к данному аллергену, остаются несвязанными и удаляются на стадии промывки. На второй стадии добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается

в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки.

Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

Некоторые аллергены нанесены на целлюлозные диски в присутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA). Для таких аллергенов следует использовать дополнительный диск с сорбированным HSA, чтобы учесть поправку на неспецифическое связывание с HSA на аллергодиске. В каталоге такие аллергенные диски имеют маркировку "- HSA".

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет: содержит нитроцеллюлозные диски с сорбированным аллергеном (96 шт.); раствор хорида натрия (0,9%); 0,1% NaN ₃	96 опред.
DiscS	Стандартные диски: количество дисков согласно заказу	10 шт
DiscC	Контрольные диски: количество дисков согласно заказу	2 шт
DiscA	Аллергодиски: количество дисков согласно заказу	1-84 шт
AllergyWP	Промывочный буфер: 16x концентрат; содержит 1% NaN ₃ ; крышка коричневого цвета	1 x 60 мл
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgE, 0,35 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgE, 0,70 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgE, 3,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgE, 17,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 5	Стандартная сыворотка 5: раствор сыворотки человека с IgE, 50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Control +	Положительный контроль IgE: раствор сыворотки человека, содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая красная крышка; готов к использованию	1 x 150 мкл
Control -	Отрицательный контроль IgE: раствор сыворотки человека, не содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая синяя крышка; готов к использованию	1 x 150 мкл
Conjugate	Конъюгат антител кролика к IgE человека: конъюгат антител с щелочной фосфатазой; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; крышка синего цвета готов к использованию	1 x 6 мл
AllergySub	Субстратный раствор: p-нитрофенил-фосфат (PNPP) в диэтаноламине; крышка черного цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
AllergyStop	Стоп-реагент: 0,2N NaOH; 7% ЭДТА; крышка зеленого цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. Контроль качества (п. 10).

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП.
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Термостат (инкубатор) для 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, положительный и отрицательный контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Стандартная сыворотка, конъюгат и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учтите, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Стоп-реагент содержит 0,2 N гидроксида натрия и 7% ЭДТА, поэтому может оказывать раздражающее воздействие. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой. В случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством мыла и воды. При попадании в глаза немедленно промойте под проточной водой в течение 15 минут с открытым веком. Проконсультируйтесь с врачом. В случае проглатывания выпить большое количество воды, избегая рвоты, и вызвать врача.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Размещение аллергодисков по лункам планшета

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, **DiscA**, вложенными в лунки согласно протоколу покупателя. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, в дополнение к дискам с аллергенами, вложен **один HSA-диск**.

В случае поступления набора с отдельными рамками, аллергенные диски поставляются вложенными в лунки стрипов. Лунки, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете, отламывают от стрипа и вставляют в рамку планшета. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, вставляется **одна лунка с HSA-диском** в дополнение к лункам с аллергенами.

9.4. Первая инкубация

Буфер, находящийся в лунках, необходимо полностью удалить. После этого в соответствующие лунки внесите по 50 мкл калибраторов (в дубликатах), положительного или отрицательного контроля, а также сывороток пациентов. Закройте планшет и инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов (рекомендуется) следует каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Следует обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз максимально весь объем лунки промывочным буфером и инкубируйте 10 минут с буфером после второй и четвертой стадий промывки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струю жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет, как описано в п. 9.5.

9.8. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируйте в течение 15 минут при 37 °С. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Измерение оптической плотности должно выполняться через диски, лежащие в лунках, при 405 нм (или 410 нм) против референтной длины волны 620 нм (или 630 нм).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °С).
2. Разведите концентрат промывочного буфера.
3. Опорожните лунки отсасыванием жидкости.
4. Внесите в лунки по 50 мкл калибраторов, положительного контроля, отрицательного контроля или исследуемых образцов сыворотки пациентов; инкубируйте в течение 60 минут при 37 °С.
5. Промойте лунки 6 раз, внося по 700 мкл промывочного буфера (автоматическая промывка) или максимально вмещающийся объем буфера (промывка вручную) в каждую лунку; при использовании ручного промывочного устройства инкубируйте промывочный раствор в лунках в течение 10 минут после второй и четвертой стадий промывки; затем удалите жидкость из лунок.
6. Внесите в лунки по 50 мкл конъюгата и инкубируйте в течение 60 минут при 37 °С.
7. Промойте планшет, как в п. 5.
8. Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора; инкубируйте в течение 15 минут при 37 °С; остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента.
9. Измерьте оптическую плотность через диски при 405 нм (410) против референтной длины волны 620 нм (630).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – показатель нестабильности или непригодности реагентов

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-5 (в дубликатах), а также положительный и отрицательный контроли. Тест считается проведенным правильно, если ОП_{405/620} для стандарта 5 больше 1.0 и полученный для контролей EAST-класс соответствует интервалу, указанному на этикетке.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- правильность хранения реагентов
- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки и рассчитанные для них EAST-классы протоколировать.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Результаты, полученные с сыворотками пациентов. Основы расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось *x* / линейная ось *y*) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (МЕ/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgE-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Затем эти данные можно интерпретировать по EAST с помощью таблицы 3. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Калибраторы в наборе RIDASCREEN® Spezifisches IgE (кат. № 004006) аттестованы по 2-му Международному Стандарту ВОЗ IRP75/502 для человеческого IgE.

11.2. Концентрации, EAST-классы и оценки

Таблица 3. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка содержания аллерген-специфического IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	нижний порог
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	слегка увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	очень высокое
≥ 100,00 *	6 (≥ 6,0) *	чрезвычайно высокое *

* определяется способом линейной экстраполяции, так как в тесте используются только 5 калибраторов.

11.3. Интерпретация результатов с использованием аллергенов, связанных с HSA, и HSA-дисков

Некоторые аллергены, такие как металлы, различные химические соединения и лекарственные вещества, а также ряд пищевых добавок сорбированы на целлюлозные диски в виде комплексов с HSA (человеческим сывороточным альбумином). Для того, чтобы учесть эффект неспецифического связывания антител с HSA, сыворотки пациентов проверяют как на диске, покрытом специфическим аллергеном в комплексе с HSA, так и на диске, покрытом одним HSA. Рассчитывают частное (Q) от деления величины ОП в лунке с аллерген-HSA-диском на ОП в лунке с HSA-диском по следующей формуле:

$$Q = \frac{\text{ОП (аллерген-HSA)}}{\text{ОП (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками

Таблица 4. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента аллерген-специфических IgE при использовании мультиаллергенных дисков.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка
0 – 0,34	0	отрицательный
≥ 0,35	≥ 1	положительный

В случае положительного результата тест следует повторить с индивидуальными аллергенными дисками.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подсчитанные концентрации IgE-антител позволяют сделать заключение о сенсibilизации пациентов относительно отдельных аллергенов или смесей аллергенов.

Не установлено прямой связи между концентрацией IgE-антител и ее клиническим значением. Поэтому результаты анализа всегда должны интерпретироваться с учетом полного клинического диагноза пациента.

Ввиду отсутствия национального и международного стандарта, а также по причине различий в технологии получения экстрактов аллергенов, могут наблюдаться различия в результатах исследований *in vivo* и *in vitro*. Измерение титра IgE-антител сразу после проявления анафилактической реакции может дать ложноотрицательные или заниженные результаты. В случае обнаружения различий в результатах исследований *in vivo* и *in vitro* тест следует повторить через 3-4 недели. Повторяющиеся несоответствия результатов анализа должны быть исследованы аллергологом с применением тестов *in vivo*, таких как провокационные тесты. Необходимо помнить, что провокационные тесты могут вызвать анафилактический шок.

Положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить потерю некоторых эпитопов отдельных аллергенов в процессе их производства, вследствие чего возможны ложноотрицательные результаты.

Показан текущий контроль за концентрацией специфического IgE при проведении гипосенсибилизации или удалении аллергенов. Хорошим дополнением к определению IgE может служить параллельное определение титров специфических IgG (набором RIDASCREEN® Spezifisches IgG, кат. № A0629), в особенности, в случаях пищевой и дыхательной аллергии, таких как «легкие любителя птиц» и «астма пекаря».

13. ДАННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТЕСТА

13.1. Вариабельность результатов в разных исследованиях

Таблица 5. Сводные данные экспериментов по вариабельности в разных исследованиях; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В разных исследованиях	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F37, F4, F85, K82
Число исследований на аллерген	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов
Арифметическое среднее С.В.	11,7 %	3,44 %	3,65 %

13.2. Вариабельность внутри одного исследования

Таблица 6. Сводные данные экспериментов по вариабельности внутри одного исследования; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В одном исследовании	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6, F2, F37, F4, F17, K82	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F27, F4, F85, K82
Число повторов на аллерген	32	32	32
Арифметическое среднее С.В.	12,69 %	3,86 %	3,88 %

13.3. Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора была определена с использованием стандартного материала, калиброванного по стандарту ВОЗ, и составила 0,24 МЕ/мл.

Аналитическая чувствительность определялась по средним значениям последовательных разведений стандартной сыворотки.

Использованный критерий: Разница измеренных значений ОПср.⁴⁰⁵⁻⁶²⁰ разведения сыворотки, соответствующего концентрации в ней IgE-антител к определенному аллергену 0,229 МЕ/мл, и предыдущего, т. е. меньшего разведения, составляет 2SD (2 величины стандартного отклонения, при доверительном уровне 95 %).

Диагностическая чувствительность составляет менее, чем 0,35 МЕ/мл.

13.4. Специфичность

Выборку аллергенов из 11 различных групп аллергенов тестировали на различных образцах сыворотки; полученные данные сравнивали с результатами анализа с использованием тест-систем других производителей и наборов для *in vitro* диагностики. Специфичность составила 91,2 %.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Набор реагентов для определения специфических IgG антител
(RIDASCREEN® Spezifisches IgG)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDASCREEN® Spezifisches IgG

Иммуноферментный тест для количественного определения специфических IgG антител к различным аллергенам в сыворотке крови человека.

аллергодиски и реагенты

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения *in vitro* специфических антител IgG-типа в сыворотке крови человека. Набор следует использовать в случаях подозрения на аллергическую реакцию III типа. Также этот тест может быть использован для отслеживания развития гипосенсибилизации, например, к токсинам перепончатокрылых и т.д.

2. ВВЕДЕНИЕ

Аллергическую реакцию III типа и ее начало можно определить с помощью обнаружения специфических IgG-антител. Аллергическая реакция III типа характеризуются образованием иммунных комплексов, которые формируются из свободных аллергенов и специфических IgG-антител. Эти иммунные комплексы также могут образовываться внешними аллергенами на поверхностях таких органов, как легкие, что приводит к появлению клинических симптомов аллергического альвеолита. «Фермерское легкое» или заболевания селекционеров голубей вызываются постоянным воздействием грибков заплесневелого сена или антигенами голубей.

Эти иммунные комплексы могут также образовываться в результате проникновения пищи или ее компонентов через стенку кишечника и их отложения в тканях, что приводит к развитию воспалительных реакций и появлению различных клинических симптомов.

Определение IgG-антител также используется для терапевтического мониторинга в случае аллергии к токсинам перепончатокрылых.

Тест RIDASCREEN® Spezifisches IgG относится к иммуноферментным методам анализа на целлюлозных дисках с иммобилизованными аллергенами (EAST). Все реагенты (A0021), перечисленные в разделе 4, признаны годными при использовании вместе с аллергодисками (A0029) фирмы R-Biopharm. При использовании этих реагентов с дисками от других поставщиков пользователь должен самостоятельно провести тест на пригодность.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Spezifisches IgG основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аллергены нанесены на целлюлозные диски, помещенные в лунки стрипов или микропланшета. Исследуемая сыворотка, стандартная сыворотка и положительный и отрицательный контроли вносят в лунки с дисками и инкубируют при 37 °C. В процессе инкубации присутствующие в образцах IgE-антитела, специфичные к определенному аллергену, связываются с иммобилизованным аллергеном, образуя комплекс антиген-антитело. IgE-антитела, не специфичные к данному аллергену, остаются несвязанными и удаляются на стадии промывки. На второй стадии добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют

субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки.

Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Микропланшет , содержащий нитроцеллюлозные диски с сорбированным аллергеном, раствор хорида натрия (0,9%); 0,1% NaN ₃	1 × 96 лунок
DiscS	Стандартные диски	2 шт
DiscC	Контрольные диски	8 шт
DiscA	Аллергодиски: количество дисков согласно заказу	1-86 шт.
AllergyPP	Буфер для разведения образцов: трис-буфер с добавлением 0,1% NaN ₃ ; готов для использования	1 × 120 мл
AllergyWP	Промывочный буфер: 16х концентрат; содержит 1% NaN ₃	1 × 60 мл
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgG, 2,5 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgG, 10 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgG, 40 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgG, 200 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Control high	Контрольный раствор положительный с IgG в высокой концентрации (концентрацию см. на флаконе): стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Control low	Контрольный раствор положительный с IgG в низкой концентрации (концентрацию см. на флаконе): стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Conjugate	Конъюгат фермента: содержит антитела козы к IgG человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой; стабилизирующий белковый раствор; белая крышка флакона; готов к использованию	1 × 6 мл
AllergySub	Раствор субстрата: содержит <i>p</i> -нитрофенил-фосфат (pNPP) в диэтаноламине; черная крышка флакона; готов к использованию	1 × 12 мл
AllergyStop	Стоп-реагент: содержит 0,2N NaOH, 7%-ный раствор ЭДТА; зеленая крышка флакона; готов к использованию	1 × 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. **Контроль качества (п. 10)**.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2 Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Инкубатор для проведения инкубации при 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Пробирки Eppendorf
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, высокий и низкий контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Концентрат промывочного буфера содержит азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Стоп-реагент содержит 0,2 N гидроксида натрия и 7% ЭДТА, поэтому может оказывать раздражающее воздействие. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой. В случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством мыла и воды. При попадании в глаза немедленно промойте под проточной водой в течение 15 минут с открытым веком. Проконсультироваться с врачом. В случае проглатывания выпить большое количество воды, избегая рвоты, и вызвать врача.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка крови		Разведенная сыворотка
2-8 °C	- 20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Предварительные комментарии

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от

указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогревания концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Заполнение микропланшета аллергодисками

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, **DiscA**, вложенными в лунки согласно протоколу покупателя.

Если набор поставляется вместе с аллергодисками **DiscA** в разделяемых стрипах, лунки со стандартными дисками **DiscS**, контрольными дисками **DiscC** и аллергодисками **DiscA** необходимо вставить в рамку планшета после разламывания стрипов, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете.

9.4. Приготовление образцов сыворотки крови пациентов

Сыворотку крови пациентов необходимо развести буфером для разведения образцов **AllergyPP** 1:100. Например, 10 мкл сыворотки + 990 мкл буфера для разведения образцов. Рекомендуется для разведения брать объем не менее 10 мкл сыворотки.

9.5. Первая инкубация

Необходимо полностью отбирать буфер, который присутствует в лунках. В соответствии со схемой расположения образцов внесите в лунки по 50 мкл каждой стандартной сыворотки **Standard 1**, **Standard 2**, **Standard 3** и **Standard 4**, контрольной сыворотки с высоким содержанием IgG-антител **Control high**, контрольной сыворотки с низким содержанием IgG-антител **Control low** и разведенных образцов сыворотки крови пациентов. После этого закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 60 мин.

9.6. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следует (рекомендуется) каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Необходимо обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз максимально весь объем лунки промывочным буфером. Не используйте для промывки пипетки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струю жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.7. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C. После этого закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 60 мин.

9.8. Промывка

Промывка – как описано в п. 9.6.

9.9. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора **AllergySub** в каждую лунку. Затем закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин. Остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента **AllergyStop**. Измерьте оптическую плотность при 405 нм против длины волны сравнения 620 нм. Планшет можно измерить снова в течение 24 часов, если он был закрыт и хранился в охлажденном состоянии.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ.

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-4 (в дубликатах), а также высокий и низкий контроли. Тест считается проведенным правильно, если оптическая плотность OD_{405/620} для стандарта 4 была выше 1,0 и количество антител класса IgG, определенное в контролях при 405/620 нм, соответствовало значениям, указанным в прилагаемом сертификате.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки. В каждом случае документируйте полученное значение концентрации IgG-антител в мкг/мл.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Заключение относительно образца сыворотки

11.1.1. Основа для расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось **x** / линейная ось **y**) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (мкг/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgG-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Затем эти данные можно интерпретировать с помощью таблицы 3. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Стандартная кривая для теста RIDASCREEN® Spezifisches IgG прокалибрована относительно международного референтного препарата ВОЗ "1st WHO IRP 67/86 for human IgG".

11.1.2. Концентрации и расчеты

Таблица 3. Соотношение между определенной концентрацией в мкг/мл и уровнем антиген-специфических IgG в сыворотке крови пациентов

мкг/мл	Содержание аллерген-специфических IgG-антител
< 7,49	отрицательный результат
7,50 – 12,49	низкое содержание
12,5 – 19,99	повышенное содержание
20 – 49,99	высокое содержание
50,0 – 200,00	очень высокое содержание

11.1.3. Интерпретация результатов для аллергенов с HSA дисками.

Определенные аллергены, например химические соединения, лекарственные препараты и некоторые пищевые добавки, невозможно связать непосредственно с целлюлозным диском. Тогда для соединения с поверхностью диска используют человеческий сывороточный альбумин (HSA). Для того, чтобы устранить влияние неспецифического связывания или исключить наличие аллергии к HSA, в каждом случае сыворотка пациента добавляется еще и в лунку с диском, несущим в качестве аллергена только HSA. Качественный результат рассчитывается как коэффициент по следующей формуле:

$$Q = \frac{OD \text{ (HSA - аллерген)}}{OD \text{ (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.1.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками.

Таблица 4. Соотношение между определенной концентрацией в мкг/мл и оценкой результата, полученного для сыворотки пациента на диске с мультиаллергенными дисками.

мкг/мл	Результат
0 – <10	Отрицательный
≥ 10	Положительный

В случае получения положительного результата на дисках со смесью аллергенов сыворотку пациента анализируют повторно на наличие специфической реакции с соответствующими индивидуальными аллергенами, включенными в смешанную панель.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgG-антител, определенные с помощью этого теста, позволяют сделать заключение о сенсибилизации пациентов по отношению к индивидуально протестированному аллергену.

Результаты не могут быть использованы для попыток выявления связи между значениями оптической плотности и появлением серьезных клинических симптомов заболевания. Результаты измерения всегда необходимо интерпретировать в совокупности с полной клинической картиной.

Несмотря на появление симптомов аллергии во время приема пищи, увеличения титра IgG-антител может не быть. Причиной может быть то, что IgG-антитела направлены непосредственно на эпитопы, которые не появляются, пока пища не переварится, или появляются впервые при промышленной обработке продуктов и таким образом не присутствуют на аллергодиске.

Используя этот тест, нельзя определить подклассы IgG-антител.

Ошибочные положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить возможности того, что эпитопы, которые запускают аллергическую реакцию, теряются при производстве аллергодисков и это может привести к получению ошибочных отрицательных результатов.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Таблица 5. Воспроизводимость данных внутри одного измерения; все расчеты были сделаны на базе определенных в тесте значениях оптической плотности OD_s.

Одно измерение	Область низких значений	Область средних значений	Область повышенных значений
Тестируемые аллергены	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4	E78, E11, E7, F183, I1, I3, M20	B7, F1, F4, F17, F2, M19, M2
Количество измерений для каждого аллергена	24	24	24
Арифметическое среднее для коэффициента вариации	7,68%	6,72%	5,22%

Таблица 6. Воспроизводимость данных в различных измерениях; все расчеты были сделаны на базе **определенных в тесте** значениях оптической плотности OD_s.

Различные измерения	Область низких значений	Область средних значений	Область повышенных значений
Тестируемые аллергены	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4, M19	B7, E11, E7, E78, F2, I1, I3, M20	F1, F17, F183, F4, M2
Количество измерений для каждого аллергена	4 x 4	4 x 4	4 x 4
Арифметическое среднее для коэффициента вариации	8,30%	8,47%	5,54%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк



ноября 2009 г.

 ООО ЦИПМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки.

Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

Некоторые аллергены нанесены на целлюлозные диски в присутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA). Для таких аллергенов следует использовать дополнительный диск с сорбированным HSA, чтобы учесть поправку на неспецифическое связывание с HSA на аллергодиске. В каталоге такие аллергенные диски имеют маркировку "- HSA".

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Стрипы 8-луночные в рамке-держателе, разделяемые на отдельные лунки, содержат раствор NaCl (0,9%) с добавлением 0,1% NaN ₃	2 шт
DiscS	Стандартные диски: количество дисков согласно заказу	10 шт
DiscC	Контрольные диски: количество дисков согласно заказу	2 шт
AllergyWP	Промывочный буфер: 16х концентрат; содержит 1% NaN ₃ ; крышка коричневого цвета	1 x 60 мл
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgE, 0,35 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgE, 0,70 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgE, 3,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgE, 17,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Standard 5	Стандартная сыворотка 5: раствор сыворотки человека с IgE, 50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 250 мкл
Control +	Положительный контроль IgE: раствор сыворотки человека, содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая красная крышка; готов к использованию	1 x 150 мкл
Control -	Отрицательный контроль IgE: раствор сыворотки человека, не содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая синяя крышка; готов к использованию	1 x 150 мкл
Conjugate	Конъюгат антител кролика к IgE человека: конъюгат антител с щелочной фосфатазой; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; крышка синего цвета готов к использованию	1 x 12 мл
AllergySub	Субстратный раствор: p-нитрофенил-фосфат (PNPP) в диэтаноламине; крышка черного цвета; готов к использованию	2 x 12 мл
AllergyStop	Стоп-реагент: 0,2N NaOH; 7% ЭДТА; крышка зеленого цвета; готов к использованию	1 x 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых

солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. Контроль качества (п. 10).

6. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП.
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Термостат (инкубатор) для 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, положительный и отрицательный контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Стандартная сыворотка, конъюгат и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Стоп-реагент содержит 0,2 М гидроксида натрия и 7% ЭДТА, поэтому может оказывать раздражающее воздействие. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой. В случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством мыла и воды. При попадании в глаза немедленно промойте под проточной водой в течение 15 минут с открытым веком. Проконсультироваться с врачом. В случае проглатывания выпить большое количество воды, избегая рвоты, и вызвать врача.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы для тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогревания концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Размещение аллергодисков по лункам планшета

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, вложенными в лунки. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, в дополнение к дискам с аллергенами, вложен **один HSA-диск**.

В случае поступления набора с отдельными рамками, аллергенные диски поставляются вложенными в лунки стрипов. Лунки, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете, отламывают от стрипа и вставляют в рамку планшета. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, вставляется **одна лунка с HSA-диском** в дополнение к лункам с аллергенами.

9.4. Первая инкубация

Буфер, находящийся в лунках, необходимо полностью удалить. После этого в соответствующие лунки внесите по 50 мкл калибраторов (в дубликатах), положительного или отрицательного контроля, а также сывороток пациентов. Закройте планшет и инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов (рекомендуется) следует каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Следует обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз весь объем лунки промывочным буфером максимально и инкубируйте 10 минут с буфером после второй и четвертой стадий промывки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струи жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет, как описано в п. 9.5.

9.8. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируйте в течение 15 минут при 37 °C. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку.

Измерение оптической плотности должно выполняться через диски, лежащие в лунках, при 405 нм (или 410 нм) против референсной длины волны 620 нм (или 630 нм).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C).
2. Разведите концентрат промывочного буфера.
3. Опорожните лунки отсасыванием жидкости.
4. Внесите в лунки по 50 мкл калибраторов, положительного контроля, отрицательного контроля или исследуемых образцов сыворотки пациентов; инкубируйте в течение 60 минут при 37 °C.
5. Промойте лунки 6 раз, внося по 700 мкл промывочного буфера (автоматическая промывка) или максимально вмещающийся объем буфера (промывка вручную) в каждую лунку; при использовании ручного промывочного устройства инкубируйте промывочный раствор в лунках в течение 10 минут после второй и четвертой стадий промывки; затем удалите жидкость из лунок.
6. Внесите в лунки по 50 мкл конъюгата и инкубируйте в течение 60 минут при 37 °C.
7. Промойте планшет, как в п. 5.
8. Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора; инкубируйте в течение 15 минут при 37 °C; остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента.
9. Измерьте оптическую плотность через диски при 405 нм (410) против референсной длины волны 620 нм (630).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – показатель нестабильности или непригодности реагентов

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-5 (в дубликатах), а также положительный и отрицательный контроли. Тест считается проведенным правильно, если $OP_{405/620}$ для стандарта 5 больше 1.0 и полученный для контролей EAST-класс соответствует интервалу, указанному на этикетке.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- правильность хранения реагентов
- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки и рассчитанные для них EAST-классы протоколировать.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Результаты, полученные с сыворотками пациентов. Основы расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось x / линейная ось y) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (МЕ/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgE-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Затем эти данные можно интерпретировать по EAST с помощью таблицы 3. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Калибраторы в наборе RIDASCREEN® Spezifisches IgE (кат. № 004006) аттестованы по 2-му Международному Стандарту ВОЗ IRP75/502 для человеческого IgE.

11.2. Концентрации, EAST-классы и оценки

Таблица 3. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка содержания аллерген-специфического IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	нижний порог
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	слегка увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	очень высокое
≥ 100,00 *	6 (≥ 6,0) *	чрезвычайно высокое *

* определяется способом линейной экстраполяции, так как в тесте используются только 5 калибраторов.

11.3. Интерпретация результатов с использованием аллергенов, связанных с HSA, и HSA-дисков

Некоторые аллергены, такие как металлы, различные химические соединения и лекарственные вещества, а также ряд пищевых добавок сорбированы на целлюлозные диски в виде комплексов с HSA (человеческим сывороточным альбумином). Для того, чтобы учесть эффект неспецифического связывания антител с HSA, сыворотки пациентов проверяют как на диске, покрытом специфическим аллергеном в комплексе с HSA, так и на диске, покрытом одним HSA. Рассчитывают частное (Q) от деления величины ОП в лунке с аллерген-HSA-диском на ОП в лунке с HSA-диском по следующей формуле:

$$Q = \frac{\text{ОП (аллерген-HSA)}}{\text{ОП (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками

Таблица 4. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента аллерген-специфических IgE при использовании мультиаллергенных дисков.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка
0 – 0,34	0	отрицательный
≥ 0,35	≥ 1	положительный

В случае положительного результата тест следует повторить с индивидуальными аллергенными дисками.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подсчитанные концентрации IgE-антител позволяют сделать заключение о сенсibilизации пациентов относительно отдельных аллергенов или смесей аллергенов.

Не установлено прямой связи между концентрацией IgE-антител и ее клиническим значением. Поэтому результаты анализа всегда должны интерпретироваться с учетом полного клинического диагноза пациента.

Ввиду отсутствия национального и международного стандарта, а также по причине различий в технологии получения экстрактов аллергенов, могут наблюдаться различия в результатах исследований *in vivo* и *in vitro*. Измерение титра IgE-антител сразу после проявления анафилактической реакции может дать ложноотрицательные или заниженные результаты. В случае обнаружения различий в результатах исследований *in vivo* и *in vitro* тест следует повторить через 3-4 недели. Повторяющиеся несоответствия результатов анализа должны быть исследованы аллергологом с применением тестов *in vivo*, таких как провокационные тесты. Необходимо помнить, что провокационные тесты могут вызвать анафилактический шок.

Положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить потерю некоторых эпитопов отдельных аллергенов в процессе их производства, вследствие чего возможны ложноотрицательные результаты.

Показан текущий контроль за концентрацией специфического IgE при проведении гипосенсибилизации или удалении аллергенов. Хорошим дополнением к определению IgE может служить параллельное определение титров специфических IgG (набором RIDASCREEN® Spezifisches IgG, кат. № A0629), в особенности, в случаях пищевой и дыхательной аллергии, таких как «легкие любителя птиц» и «астма пекаря».

13. ДАННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТЕСТА

13.1. Вариабельность результатов в разных исследованиях

Таблица 5. Сводные данные экспериментов по вариабельности в разных исследованиях; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В разных исследованиях	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F37, F4, F85, K82
Число исследований на аллерген	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов
Арифметическое среднее С.В.	11,7 %	3,44 %	3,65 %

13.2. Вариабельность внутри одного исследования

Таблица 6. Сводные данные экспериментов по вариабельности внутри одного исследования; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В одном исследовании	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6, F2, F37, F4, F17, K82	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F27, F4, F85, K82
Число повторов на аллерген	32	32	32
Арифметическое среднее С.В.	12,69 %	3,86 %	3,88 %

13.3. Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора была определена с использованием стандартного материала, калиброванного по стандарту ВОЗ; и составила 0,24 МЕ/мл.

Аналитическая чувствительность определялась по средним значениям последовательных разведений стандартной сыворотки.

Использованный критерий: Разница измеренных значений ОПср.⁴⁰⁵⁻⁶²⁰ разведения сыворотки, соответствующего концентрации в ней IgE-антител к определенному аллергену 0,229 МЕ/мл, и предыдущего, т. е. меньшего разведения, составляет 2SD (2 величины стандартного отклонения, при доверительном уровне 95 %).

Диагностическая чувствительность составляет менее, чем 0,35 МЕ/мл.

13.4. Специфичность

Выборку аллергенов из 11 различных групп аллергенов тестировали на различных образцах сыворотки; полученные данные сравнивали с результатами анализа с использованием тест-систем других производителей и наборов для *in vitro* диагностики. Специфичность составила 91,2 %.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»

М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ**

**Набор реагентов для определения специфических IgG антител
(RIDASCREEN® Spezifisches IgG Reagenziensatz)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Spezifisches IgG Reagenziensatz

Иммуноферментный тест для количественного определения специфических IgG антител к различным аллергенам в сыворотке крови человека.

Набор рассчитан на 96 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения *in vitro* специфических антител IgG-типа в сыворотке крови человека. Набор следует использовать в случаях подозрения на аллергическую реакцию III типа. Также этот тест может быть использован для отслеживания развития гипосенсибилизации, например, к токсинам перепончатокрылых и т.д.

2. ВВЕДЕНИЕ

Аллергическую реакцию III типа и ее начало можно определить с помощью обнаружения специфических IgG-антител. Аллергическая реакция III типа характеризуется образованием иммунных комплексов, которые формируются из свободных аллергенов и специфических IgG-антител. Эти иммунные комплексы также могут образовываться внешними аллергенами на поверхностях таких органов, как легкие, что приводит к появлению клинических симптомов аллергического альвеолита. «Фермерское легкое» или заболевания селекционеров голубей вызываются постоянным воздействием грибков заплесневелого сена или антигенами голубей.

Эти иммунные комплексы могут также образовываться в результате проникновения пищи или ее компонентов через стенку кишечника и их отложения в тканях, что приводит к развитию воспалительных реакций и появлению различных клинических симптомов.

Определение IgG-антител также используется для терапевтического мониторинга в случае аллергии к токсинам перепончатокрылых.

Тест RIDASCREEN® Spezifisches IgG Reagenziensatz относится к иммуноферментным методам анализа на целлюлозных дисках с иммобилизованными аллергенами (EAST). Все реагенты (A0021), перечисленные в разделе 4, признаны годными при использовании вместе с аллергодисками (A0029) фирмы R-Biopharm. При использовании этих реагентов с дисками от других поставщиков пользователь должен самостоятельно провести тест на пригодность.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Spezifisches IgG Reagenziensatz основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аллергены нанесены на целлюлозные диски, помещенные в лунки стрипов или микропланшета. Исследуемая сыворотка, стандартная сыворотка и положительный и отрицательный контроли вносят в лунки с дисками и инкубируют при 37 °C. В процессе инкубации присутствующие в образцах IgE-антитела, специфичные к определенному аллергену, связываются с иммобилизованным аллергеном, образуя комплекс антиген-антитело. IgE-антитела, не специфичные к данному аллергену, остаются несвязанными и удаляются на стадии промывки. На второй стадии добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного

конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки. Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений) (кат. № A 0021).

Plate	Стрипы 8-луночные в рамке-держателе, разделяемые на отдельные лунки, содержат раствор NaCl (0,9%) с добавлением 0,1% NaN ₃	2 шт
DiscS	Стандартные диски: количество дисков согласно заказу	8 шт
DiscC	Контрольные диски: количество дисков согласно заказу	2 шт
AllergyPP	Буфер для разведения образцов: трис-буфер с добавлением 0,1% NaN ₃ ; готов для использования	1 × 120 мл
AllergyWP	Промывочный буфер: 16x концентрат; содержит 1% NaN ₃	1 × 60 мл
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgG, 2,5 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgG, 10 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgG, 40 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgG, 200 мкг/мл; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃	1 × 250 мкл
Control high	Контрольная сыворотка крови человека с высоким уровнем IgG (концентрацию см. на флаконе): содержит стабилизирующий белковый раствор; готова для использования	1 × 250 мкл
Control low	Контрольная сыворотка крови человека с низким уровнем IgG (концентрацию см. на флаконе): содержит стабилизирующий белковый раствор и 0,1% NaN ₃ ; готова для использования	1 × 250 мкл
Conjugate	Конъюгат антител козы к IgG человека: конъюгат антител с щелочной фосфатазой; стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; белая крышка флакона; готов к использованию	1 × 6 мл
AllergySub	Субстратный раствор: содержит p-нитрофенил-фосфат (pNPP) в диэтаноламине; черная крышка флакона; готов к использованию	1 × 12 мл
AllergyStop	Стоп-реагент: содержит 0,2N NaOH, 7%-ный раствор ЭДТА; зеленая крышка флакона; готов к использованию	1 × 12 мл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. **Контроль качества (п. 10)**.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Инкубатор для проведения инкубации при 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Пробирки Eppendorf
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, высокий и низкий контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Концентрат промывочного буфера содержит азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учтите, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Стоп-реагент содержит 0,2 N гидроксида натрия и 7% ЭДТА, поэтому может оказывать раздражающее воздействие. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой. В случае контакта с кожей немедленно промойте большим количеством мыла и воды. При попадании в глаза немедленно промойте под проточной водой в течение 15 минут с открытым веком. Проконсультироваться с врачом. В случае проглатывания выпить большое количество воды, избегая рвоты, и вызвать врача.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы для тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка крови		Разведенная сыворотка
2-8 °C	- 20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Предварительные комментарии

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от

указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Заполнение микропланшета аллергодисками

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, **DiscA**, вложенными в лунки согласно протоколу покупателя.

Если набор поставляется вместе с аллергодисками **DiscA** в разделяемых стрипах, лунки со стандартными дисками **DiscS**, контрольными дисками **DiscC** и аллергодисками **DiscA** необходимо вставить в рамку планшета после разламывания стрипов, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете.

9.4. Приготовление образцов сыворотки крови пациентов

Сыворотку крови пациентов необходимо развести буфером для разведения образцов **AllergyPP** 1:100. Например, 10 мкл сыворотки + 990 мкл буфера для разведения образцов. Рекомендуется для разведения брать объем не менее 10 мкл сыворотки.

9.5. Первая инкубация

Необходимо полностью отбирать буфер, который присутствует в лунках. В соответствии со схемой расположения образцов внесите в лунки по 50 мкл каждой стандартной сыворотки **Standard 1**, **Standard 2**, **Standard 3** и **Standard 4**, контрольной сыворотки с высоким содержанием IgG-антител **Control high**, контрольной сыворотки с низким содержанием IgG-антител **Control low** и разведенных образцов сыворотки крови пациентов. После этого закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 60 мин.

9.6. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов следует (рекомендуется) каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Необходимо обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз максимально весь объем лунки промывочным буфером. Не используйте для промывки пипетки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струю жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.7. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C. После этого закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 60 мин.

9.8. Промывка

Промывка – как описано в п. 9.6.

9.9. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора **AllergySub** в каждую лунку. Затем закройте планшет **Plate** и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин. Остановите реакцию добавлением в каждую лунку по 50 мкл стоп-реagenta **AllergyStop**. Измерьте оптическую плотность при 405 нм против длины волны сравнения 620 нм. Планшет можно измерить снова в течение 24 часов, если он был закрыт и хранился в охлажденном состоянии.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – ИНДИКАЦИЯ ОКОНЧАНИЯ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ.

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-4 (в дубликатах), а также высокий и низкий контроли. Тест считается проведенным правильно, если оптическая плотность OD_{405/620} для стандарта 4 была выше 1,0 и количество антител класса IgG, определенное в контролях при 405/620 нм, соответствовало значениям, указанным в прилагаемом сертификате.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Если полученные результаты не укладываются в ожидаемые значения, прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки. В каждом случае документируйте полученное значение концентрации IgG-антител в мкг/мл.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Заключение относительно образца сыворотки

11.1.1. Основа для расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось *x* / линейная ось *y*) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (мкг/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgG-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Затем эти данные можно интерпретировать с помощью таблицы 3. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Стандартная кривая для теста RIDASCREEN® Spezifisches IgG Reagenziensatz прокалибрована относительно международного референтного препарата ВОЗ "1st WHO IRP 67/86 for human IgG".

11.1.2. Концентрации и расчеты

Таблица 3. Соотношение между определенной концентрацией в мкг/мл и уровнем антиген-специфических IgG в сыворотке крови пациентов

мкг/мл	Содержание аллерген-специфических IgG-антител
< 7,49	отрицательный результат
7,50 – 12,49	низкое содержание
12,5 – 19,99	повышенное содержание
20 – 49,99	высокое содержание
50,0 – 200,00	очень высокое содержание

11.1.3. Интерпретация результатов для аллергенов с HSA дисками.

Определенные аллергены, например химические соединения, лекарственные препараты и некоторые пищевые добавки, невозможно связать непосредственно с целлюлозным диском. Тогда для соединения с поверхностью диска используют человеческий сывороточный альбумин (HSA). Для того, чтобы устранить влияние неспецифического связывания или исключить наличие аллергии к HSA, в каждом случае сыворотка пациента добавляется еще и в лунку с диском, несущим в качестве аллергена только HSA. Качественный результат рассчитывается как коэффициент по следующей формуле:

$$Q = \frac{OD \text{ (HSA - аллерген)}}{OD \text{ (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.1.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками.

Таблица 4. Соотношение между определенной концентрацией в мкг/мл и оценкой результата, полученного для сыворотки пациента на диске с мультиаллергенными дисками.

мкг/мл	Результат
0 – <10	Отрицательный
≥ 10	Положительный

В случае получения положительного результата на дисках со смесью аллергенов сыворотку пациента анализируют повторно на наличие специфической реакции с соответствующими индивидуальными аллергенами, включенными в смешанную панель.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgG-антител, определенные с помощью этого теста, позволяют сделать заключение о сенсибилизации пациентов по отношению к индивидуально протестированному аллергену.

Результаты не могут быть использованы для попыток выявления связи между значениями оптической плотности и появлением серьезных клинических симптомов заболевания. Результаты измерения всегда необходимо интерпретировать в совокупности с полной клинической картиной.

Несмотря на появление симптомов аллергии во время приема пищи, увеличения титра IgG-антител может не быть. Причиной может быть то, что IgG-антитела направлены непосредственно на эпитопы, которые не появляются, пока пища не переварится, или появляются впервые при промышленной обработке продуктов и таким образом не присутствуют на аллергодиске.

Используя этот тест, нельзя определить подклассы IgG-антител.

Ошибочные положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить возможности того, что эпитопы, которые запускают аллергическую реакцию, теряются при производстве аллергодисков и это может привести к получению ошибочных отрицательных результатов.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Таблица 5. Воспроизводимость данных внутри одного измерения; все расчеты были сделаны на базе определенных в тесте значениях оптической плотности OD_s.

Одно измерение	Область низких значений	Область средних значений	Область повышенных значений
Тестируемые аллергены	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4	E78, E11, E7, F183, I1, I3, M20	B7, F1, F4, F17, F2, M19, M2
Количество измерений для каждого аллергена	24	24	24
Арифметическое среднее для коэффициента вариации	7,68%	6,72%	5,22%

Таблица 6. Воспроизводимость данных в различных измерениях; все расчеты были сделаны на базе **определенных в тесте** значениях оптической плотности OD_s.

Различные измерения	Область низких значений	Область средних значений	Область повышенных значений
Тестируемые аллергены	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4, M19	B7, E11, E7, E78, F2, I1, I3, M20	F1, F17, F183, F4, M2
Количество измерений для каждого аллергена	4 x 4	4 x 4	4 x 4
Арифметическое среднее для коэффициента вариации	8,30%	8,47%	5,54%

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения специфических IgE антител
(RIDASCREEN® Spez. IgE Standard- und Kontrollsatz)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDASCREEN® Spez. IgE Standard- und Kontrollsatz

Иммуноферментный тест для определения специфических IgE в сыворотке крови человека.

Набор калибраторов и контролей

1. НАЗНАЧЕНИЕ

RIDASCREEN® Spez. IgE Standard- und Kontrollsatz является диагностическим тестом для количественного определения *in vitro* аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови человека. Используется для подтверждения диагноза при подозрении на аллергию по клинической картине или результатам диагностики *in vivo*.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии.

В случае проявления аллергической реакции возможно определение аллергического агента, ставшего причиной реакции, путем обнаружения специфических антител класса IgE в сыворотке крови. Этот метод также можно использовать для определения бессимптомной сенсибилизации.

RIDASCREEN® Spez. IgE Standard- und Kontrollsatz тест основан на проведении ИФА на целлюлозных дисках, на которые нанесены аллергены. Все реагенты, перечисленные в п. 4 прошли испытания вместе с аллергодисками фирмы R-Biopharm (A 0049) и полностью совместимы с ними. Если предполагается использовать эти реагенты с аллергодисками от других производителей, пользователь должен проверить их совместимость.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDASCREEN® Spez. IgE Standard- und Kontrollsatz основан на принципе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Аллергены нанесены на целлюлозные диски, помещенные в лунки стрипов или микропланшета. Исследуемая сыворотка, стандартная сыворотка и положительный и отрицательный контроли вносят в лунки с дисками и инкубируют при 37 °C. В процессе инкубации присутствующие в образцах IgE-антитела, специфичные к определенному аллергену, связываются с иммобилизованным аллергеном, образуя комплекс антиген-антитело. IgE-антитела, не специфичные к данному аллергену, остаются несвязанными и удаляются на стадии промывки. На второй стадии добавляют

антитела к IgE человека, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Избыток несвязанного конъюгата удаляют промывкой. Затем к дискам добавляют субстрат. В результате ферментативной реакции щелочной фосфатазы бесцветный субстрат превращается в продукт желтого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgE-антител человека в исследуемом образце сыворотки.

Оценка результата реакции производится измерением оптической плотности на планшетном спектрофотометре при основной длине волны 405 нм и референтной длине волны 620 нм.

Некоторые аллергены нанесены на целлюлозные диски в присутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA). Для таких аллергенов следует использовать дополнительный диск с сорбированным HSA, чтобы учесть поправку на неспецифическое связывание с HSA на аллергодиске. В каталоге такие аллергенные диски имеют маркировку "- HSA".

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Plate	Стрипы 8-луночные в рамке-держателе, разделяемые на отдельные лунки, содержат раствор NaCl (0,9%) с добавлением 0,1% NaN ₃	6 шт
DiscS	Стандартные диски: количество дисков согласно заказу	40 шт
DiscC	Контрольные диски: количество дисков согласно заказу	8 шт
Standard 1	Стандартная сыворотка 1: раствор сыворотки человека с IgE, 0,35 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 500 мкл
Standard 2	Стандартная сыворотка 2: раствор сыворотки человека с IgE, 0,70 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 500 мкл
Standard 3	Стандартная сыворотка 3: раствор сыворотки человека с IgE, 3,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 500 мкл
Standard 4	Стандартная сыворотка 4: раствор сыворотки человека с IgE, 17,50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 500 мкл
Standard 5	Стандартная сыворотка 5: раствор сыворотки человека с IgE, 50 ME IgE/мл; в стабилизированном белковом растворе; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 500 мкл
Control +	Положительный контроль IgE: раствор сыворотки человека, содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая красная крышка; готов к использованию	1 x 300 мкл
Control -	Отрицательный контроль IgE: раствор сыворотки человека, не содержащий IgE человека (концентрацию см. на флаконе); стабилизированный белковый раствор; содержит 0,1% NaN ₃ ; маленькая синяя крышка; готов к использованию	1 x 300 мкл
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер может использоваться в течение 4 недель (температура хранения 2-8 °C). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за гидролиза. Если субстрат приобрел желтую окраску, он становится непригодным для использования. Также см. Контроль качества (п. 10).

6. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Микропланшетный фотометр (405 и 620 нм), интервал измерения от 0 до 3,5 ОП.
- Промывочное устройство для микропланшетов или оборудование для ручной промывки
- Термостат (инкубатор) для 37 °C
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 10-100 мкл
- Многоканальные пипетки
- Мерный цилиндр на 1000 мл

7. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Только для *in vitro* диагностики.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками; после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Контрольные сыворотки (стандартные сыворотки, положительный и отрицательный контроли) показали отрицательные результаты в тестах на HBsAg, антитела к ВИЧ, ВГС, антиген ВИЧ-1 и на сифилис CFR 21.640. Однако контроли и стандарты, так же как и образцы пациентов, следует считать потенциально опасными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.

Стандартная сыворотка, содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови, для предотвращения гемолиза, сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C). Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор сразу же вернуть на хранение при 2-8 °C.

Стандарты, контроли и аллергодиски используются только один раз. Реагенты и диски нельзя использовать, если упаковка была повреждена или была обнаружена утечка из флакона.

Нельзя смешивать компоненты из наборов разных лотов.

Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, соблюдения последовательности промывок стрипов. Отклонение от предписанного времени или температуры инкубации может привести к сдвигу стандартной кривой от указанной в сертификате. Сильный сдвиг стандартной кривой приводит к получению неправильных результатов.

Избегайте попадания прямых солнечных лучей на стрипы во время инкубации. Рекомендуем закрывать микропланшет крышкой.

Влажную камеру для инкубации микропланшета использовать не следует.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера **AllergyWP** в мерный цилиндр и доведите объем до 1000 мл дистиллированной водой. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

9.3. Размещение аллергодисков по лункам планшета

Микропланшеты **Plate** поставляются с дисками **DiscS**, **DiscC**, вложенными в лунки согласно протоколу покупателя. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, в дополнение к дискам с аллергенами, вложен **один HSA-диск**.

В случае поступления набора с отдельными рамками, аллергенные диски поставляются вложенными в лунки стрипов. Лунки, согласно индивидуальному протоколу размещения лунок на планшете, отламывают от стрипа и вставляют в рамку планшета. Для каждого пациента, проверяемого на HSA-аллергенах, вставляется **одна лунка с HSA-диском** в дополнение к лункам с аллергенами.

9.4. Первая инкубация

Буфер, находящийся в лунках, необходимо полностью удалить. После этого в соответствующие лунки внесите по 50 мкл калибраторов (в дубликатах), положительного или отрицательного контроля, а также сывороток пациентов. Закройте планшет и инкубируйте при температуре 37 °C в течение 60 минут.

9.5. Промывка

Лунки следует промыть 6 раз, заполняя лунки промывочным буфером и затем опорожняя их. Последнюю порцию промывочного буфера необходимо удалить полностью. Все диски остаются в лунках.

При использовании автоматического промывочного устройства для микропланшетов (рекомендуется) следует каждый раз промывать лунки 700 мкл промывочного буфера и при этом использовать режим переполнения (overflow). Следует обеспечить правильную подгонку промывочного устройства к используемому типу микропланшета.

При промывке планшета с помощью ручного промывочного устройства заполняйте каждый раз весь объем лунки промывочным буфером максимально и инкубируйте 10 минут с буфером после второй и четвертой стадий промывки.

Как при автоматической, так и при ручной промывке струи жидкости следует направлять на края аллергодисков, так чтобы диски вращались вокруг своей собственной оси – это должно обеспечить наилучшую эффективность промывки.

Никогда не сокращайте число промывочных циклов или время инкубации!

9.6. Вторая инкубация

Добавьте в лунки по 50 мкл конъюгата **Conjugate**. Закройте планшет и инкубируйте в течение 60 минут при температуре 37 °C.

9.7. Промывка

Промойте планшет, как описано в п. 9.5.

9.8. Третья инкубация и измерение

Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора в каждую лунку. Инкубируйте в течение 15 минут при 37 °C. Остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку. Измерение оптической плотности должно выполняться через диски, лежащие в лунках, при 405 нм (или 410 нм) против референтной длины волны 620 нм (или 630 нм).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Доведите температуру всех реагентов, исследуемых сывороток пациентов и микропланшета до комнатной (20-25 °C).
2. Разведите концентрат промывочного буфера.
3. Опорожните лунки отсасыванием жидкости.
4. Внесите в лунки по 50 мкл калибраторов, положительного контроля, отрицательного контроля или исследуемых образцов сыворотки пациентов; инкубируйте в течение 60 минут при 37 °C.
5. Промойте лунки 6 раз, внося по 700 мкл промывочного буфера (автоматическая промывка) или максимально вмещающийся объем буфера (промывка вручную) в каждую лунку; при использовании ручного промывочного устройства инкубируйте промывочный раствор в лунках в течение 10 минут после второй и четвертой стадий промывки; затем удалите жидкость из лунок.
6. Внесите в лунки по 50 мкл конъюгата и инкубируйте в течение 60 минут при 37 °C.
7. Промойте планшет, как в п. 5.

8. Добавьте по 100 мкл готового к использованию субстратного раствора; инкубируйте в течение 15 минут при 37 °C; остановите реакцию добавлением 50 мкл стоп-реагента.
9. Измерьте оптическую плотность через диски при 405 нм (410) против референтной длины волны 620 нм (630).

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – показатель нестабильности или непригодности реагентов

Для каждой постановки необходимо использовать стандарты 1-5 (в дубликатах), а также положительный и отрицательный контроли. Тест считается проведенным правильно, если ОП_{405/620} для стандарта 5 больше 1.0 и полученный для контролей EAST-класс соответствует интервалу, указанному на этикетке.

Если ожидаемые контрольные величины не подтверждаются или наблюдается помутнение реагентов, изменение окраски субстрата на желтую до внесения в лунки, это может указывать на истечение срока годности реагентов.

Прежде чем повторять анализ, пожалуйста, проверьте следующее:

- правильность хранения реагентов
- срок годности реагентов
- калибровку используемого оборудования
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, разрушения или протечек; субстрат нельзя использовать, если он приобрел желтую окраску.

Если данные контроля качества не соответствуют требованиям и после повторного анализа, пожалуйста, обратитесь к своему дилеру.

Рекомендуется в каждом исследовании в качестве известных контролей дополнительно использовать собственные сыворотки и рассчитанные для них EAST-классы протоколировать.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Результаты, полученные с сыворотками пациентов. Основы расчетов

Для количественных оценок необходимо построить калибровочную кривую. По этой причине все стандарты одновременно тестируются в дубликатах. Чтобы построить калибровочную кривую, нанесите на полулогарифмическую бумагу (логарифмическая ось *x* / линейная ось *y*) средние значения оптической плотности, полученные для парного определения стандартов, как функцию концентрации антител (МЕ/мл), соединив полученные точки отрезками прямой. Калибровочная кривая может быть использована для определения концентрации специфических IgE-антител в образце по величине измеренной оптической плотности. Затем эти данные можно интерпретировать по EAST с помощью таблицы 3. Оценки также можно делать с помощью компьютера, используя подходящее программное обеспечение.

Калибраторы аттестованы по 2-му Международному Стандарту ВОЗ IRP75/502 для человеческого IgE.

11.2. Концентрации, EAST-классы и оценки

Таблица 3. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка содержания аллерген-специфического IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	нижний порог
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	слегка увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	очень высокое
≥ 100,00 *	6 (≥ 6,0) *	чрезвычайно высокое *

* определяется способом линейной экстраполяции, так как в тесте используются только 5 калибраторов.

11.3. Интерпретация результатов с использованием аллергенов, связанных с HSA, и HSA-дисков

Некоторые аллергены, такие как металлы, различные химические соединения и лекарственные вещества, а также ряд пищевых добавок сорбированы на целлюлозные диски в виде комплексов с HSA (человеческим сывороточным альбумином). Для того, чтобы учесть эффект неспецифического связывания антител с HSA, сыворотки пациентов проверяют как на диске, покрытом специфическим аллергеном в комплексе с HSA, так и на диске, покрытом одним HSA. Рассчитывают частное (Q) от деления величины ОП в лунке с аллерген-HSA-диском на ОП в лунке с HSA-диском по следующей формуле:

$$Q = \frac{\text{ОП (аллерген-HSA)}}{\text{ОП (HSA)}}$$

Результат отрицательный, если $Q \leq 2$; результат положительный, если $Q > 2$.

11.4. Интерпретация результатов, полученных с мультиаллергенными дисками

Таблица 4. Соотношение между измеренной концентрацией в МЕ/мл, EAST-классами и оценкой содержания в сыворотке пациента аллерген-специфических IgE при использовании мультиаллергенных дисков.

МЕ/мл	EAST-класс	Оценка
0 – 0,34	0	отрицательный
$\geq 0,35$	≥ 1	положительный

В случае положительного результата тест следует повторить с индивидуальными аллергенными дисками.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подсчитанные концентрации IgE-антител позволяют сделать заключение о сенсibilизации пациентов относительно отдельных аллергенов или смесей аллергенов.

Не установлено прямой связи между концентрацией IgE-антител и ее клиническим значением. Поэтому результаты анализа всегда должны интерпретироваться с учетом полного клинического диагноза пациента.

Ввиду отсутствия национального и международного стандарта, а также по причине различий в технологии получения экстрактов аллергенов, могут наблюдаться различия в результатах исследований *in vivo* и *in vitro*. Измерение титра IgE-антител сразу после проявления анафилактической реакции может дать ложноотрицательные или заниженные результаты. В случае обнаружения различий в результатах исследований *in vivo* и *in vitro* тест следует повторить через 3-4 недели. Повторяющиеся несоответствия результатов анализа должны быть исследованы аллергологом с применением тестов *in vivo*, таких как провокационные тесты. Необходимо помнить, что провокационные тесты могут вызвать анафилактический шок.

Положительные результаты тестирования могут быть получены из-за перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

Нельзя исключить потерю некоторых эпитопов отдельных аллергенов в процессе их производства, вследствие чего возможны ложноотрицательные результаты.

Показан текущий контроль за концентрацией специфического IgE при проведении гипосенсибилизации или удалении аллергенов. Хорошим дополнением к определению IgE может служить параллельное определение титров специфических IgG (набором RIDASCREEN® Spezifisches IgG, кат. № A0629), в особенности, в случаях пищевой и дыхательной аллергии, таких как «легкие любителя птиц» и «астма пекаря».

13. ДАННЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТЕСТА

13.1. Вариабельность результатов в разных исследованиях

Таблица 5. Сводные данные экспериментов по вариабельности в разных исследованиях; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

В разных исследованиях	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F37, F4, F85, K82
Число исследований на аллерген	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов	8 по 4 повторов
Арифметическое среднее C.V.	11,7 %	3,44 %	3,65 %

13.2. Вариабельность внутри одного исследования

Таблица 6. Сводные данные экспериментов по вариабельности внутри одного исследования; все расчеты сделаны по результатам, выраженным в МЕ/мл.

<i>В одном исследовании</i>	EAST-классы 1-2	EAST-классы 3-4	EAST-классы 5-6
Тестируемые аллергены	G6, T3, W6, D2, E1, M6, F2, F37, F4, F17, K82	G6, T3, W6, D2, E1, I3, M6, F37, F4, F17, F49, F85, SX1, K82	G6, T3, W6, D2, I3, F27, F4, F85, K82
Число повторов на аллерген	32	32	32
Арифметическое среднее C.V.	12,69 %	3,86 %	3,88 %

13.3. Чувствительность

Аналитическая чувствительность набора была определена с использованием стандартного материала, калиброванного по стандарту ВОЗ; и составила 0,24 МЕ/мл.

Аналитическая чувствительность определялась по средним значениям последовательных разведений стандартной сыворотки.

Использованный критерий: Разница измеренных значений ОПср.⁴⁰⁵⁻⁶²⁰ разведения сыворотки, соответствующего концентрации в ней IgE-антител к определенному аллергену 0,229 МЕ/мл, и предыдущего, т. е. меньшего разведения, составляет 2SD (2 величины стандартного отклонения, при доверительном уровне 95 %).

Диагностическая чувствительность составляет менее, чем 0,35 МЕ/мл.

13.4. Специфичность

Выборку аллергенов из 11 различных групп аллергенов тестировали на различных образцах сыворотки; полученные данные сравнивали с результатами анализа с использованием тест-систем других производителей и наборов для *in vitro* диагностики. Специфичность составила 91,2 %.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано _____
прошнуровано и укреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель А
(RIDA® AllergyScreen Panel A)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDA® AllergyScreen Panel A (пищевые аллергены)

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для полуколичественного определения *in vitro* циркулирующих аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины класса E впервые были обнаружены в 1964 г. и играют важную роль в запуске аллергических реакций 1 типа.

В-лимфоциты после трансформации в так называемые плазматические клетки выделяют антитела разных классов, которые циркулируют в кровяном русле и отвечают за гуморальный иммунитет.

Преобразование В-лимфоцитов в секретирующие антитела плазматические клетки регулируется Т-хелперами и Т-суппрессорами (подклассы Т-лимфоцитов). Если такая регуляция теряется, преобразование В-лимфоцитов начинает происходить под действием безвредных в нормальных условиях антигенов. Образовавшиеся в таком случае плазматические клетки будут преимущественно продуцировать антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса E.

Эти иммуноглобулины мигрируют с током крови к базофильным гранулоцитам и тучным клеткам, где они связываются со специфическими рецепторами своими Fc-участками. Если организм продолжает контактировать со специфическим аллергеном, тогда этот аллерген будет мигрировать непосредственно к IgE-антителам, прикрепленным к рецепторам, и связываться своими эпитопами с fab-фрагментами двух соседних молекул IgE, специфичных к данному аллергену. Образование этой связи приводит к высвобождению из тучных клеток различных вазоактивных аминов, в особенности к высвобождению гистамина, который вместе с другими высокоактивными медиаторами может вызывать типичные симптомы аллергической реакции 1 типа, такие как чувство жжения, крапивница или аллергическая сыпь, дерматиты, аллергический ринит, сенная лихорадка, астма и анафилактический шок.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel A основан на принципе иммуноблотинга. Индивидуальные аллергены иммобилизованы на поверхности нитроцеллюлозной мембраны (стрипа), закрепленной на дне пластиковой реакционной кассеты. Сыворотки пациентов вносят в углубление кассеты и инкубируют при комнатной температуре. При этом специфические IgE-антитела взаимодействуют с соответствующими иммобилизованными аллергенами и связываются таким образом с нитроцеллюлозной мембраной. Не связанный материал удаляют промывкой. После этого добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с биотином (выявляющие антитела), и проводят инкубацию при комнатной температуре. Выявляющие антитела образуют комплексы со специфическими IgE в тестовых зонах нитроцеллюлозного

стрипа. Избыток не связанных выявляющих антител удаляют промывкой. Затем добавляют стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и инкубируют при комнатной температуре. Конъюгат стрептавида связывается с биотином в тестовых зонах, а также в зоне положительного контроля. Избыток несвязанного конъюгата стрептавида удаляют промывкой. При добавлении субстрата и инкубации при комнатной температуре происходит цветная ферментативная реакция щелочной фосфатазы, приводящая к появлению окрашенных полос в тестовых зонах. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию специфических антител в исследуемом образце сыворотки. Полуколичественная оценка результата реакции производится (после полного высыхания стрипа) по специальному цветовому шаблону, вкладываемому в набор.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Одна упаковка набора RIDA® AllergyScreen Panel A (10 пищевых аллергенов) содержит:

Membrane	Тестовые стрипы: в индивидуальных реакционных кассетах; полоски нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными аллергенами (10 тестовых полос)	10 опред.
Wash	Промывочный буфер: 25х концентрат; Трис / NaCl, содержит 0,1 % NaN ₃ ; при разведении дает 1 × 500 мл промывочного буфера; pH 7,5	1 × 20 мл
Antibody	Выявляющие антитела: биотинилированные антитела козы к IgE человека; содержит 0,1 % NaN ₃ ; готов к использованию	1 × 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавида: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02 % метилизотиазолинола и 0,02 % бромнитродексана; готов к использованию	1 × 4 мл
Substrate	Субстратный раствор: BCIP / NTB (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой); готов к использованию	1 × 4 мл
	Оценочный шаблон: слева: цветная шкала, соответствующая классам 0-4; справа: расположение аллергенов на панели A	1
	Инструкция по применению	

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Вортекс
- Мерный цилиндр объемом 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 400 мкл
- Лабораторный флакон-диспенсер для буфера объемом 500 мл
- Промывочный планшет для 10 реакционных кассет (не обязательно)
- Светозащитный пенал для проведения инкубации в условиях темноты (полную систему, состоящую из промывочного планшета и пенала для инкубации, можно приобрести у R-Biopharm)
- Горизонтальный шейкер (не обязательно)
- Бытовой фен для сушки волос (не обязательно)

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор RIDA® AllergyScreen Panel A предназначен для *in vitro* определения антител к специфическим IgE в сыворотке крови человека. Поэтому исследуемые образцы следует считать потенциально инфицированными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Выявляющие антитела и концентрат промывочного буфера набора RIDA® AllergyScreen Panel A содержат в качестве консерванта азид натрия. Не допускайте попадания этих растворов на кожу или слизистые. Следует учитывать, что при контакте этих растворов со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.
- Конъюгат стрептавида RIDA® AllergyScreen Panel A содержит в качестве консерванта субтоксические концентрации метилизотиазолинола и бромнитродексана.
- После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- Не допускается замена или использование отдельных компонентов из наборов других серий.

- В случае повреждения наружной упаковки вложенные в нее отдельные компоненты набора можно использовать только вместе. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена индивидуальная упаковка или протекли флаконы.

7. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Тест необходимо открывать непосредственно перед проведением анализа. После забора крови во избежание гемолиза сыворотку от сгустка следует отделять как можно быстрее. Образцы до анализа следует хранить охлажденными при температуре 2-8 °С или замороженными. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инаktivированных прогреванием, липемических, гемолизированных, иктерических или мутных может привести к получению ложных результатов.

Неразведенная сыворотка	
2-8 °С	-20 °С
1 неделя	более 1 недели

Кассеты со стрипами необходимо хранить в плотно закрытой пластиковой упаковке в сухом, темном, прохладном месте. Все реагенты следует хранить при 2-8 °С и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Микробная контаминация должна быть исключена. После истечения срока годности качество набора не гарантируется. Разведенный промывочный буфер может храниться до 4 недель при температуре 2-8 °С.

Контаминация субстратного раствора и конъюгата стрептавидина должна быть полностью исключена, поскольку она приводит к окрашиванию субстрата. Следует также предохранять субстрат от воздействия прямых солнечных лучей, во избежание его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

8. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Помутнение или голубоватое окрашивание субстрата, появившееся при хранении, указывает на порчу этого реагента.

9. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор RIDA® AllergyScreen Panel A был разработан для анализа сыворотки крови человека. Образцы крови следует собирать методом венопункции и, после коагуляции в течение 30–40 минут, отделять сыворотку центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g. Необходимо полностью исключить повторное замораживание, а также микробную контаминацию образцов. Использование образцов, инаktivированных прогреванием, равно как гемолизированных, липемических, иктерических или мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

При невозможности немедленного исследования, образцы можно хранить до 1 недели при 2-8 °С. Более длительное хранение допускается в замороженном состоянии при температуре –20 °С и ниже.

10. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1. Общие замечания

Перед постановкой исследования доведите температуру всех реагентов и кассет со стрипами до комнатной. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, тщательности и единообразия промывки стрипов. Не проводите тест на прямом солнечном свете. Для того, чтобы избежать потерь жидкости за счет испарения, рекомендуется закрывать кассету во время инкубации. Кассету следует брать только за специальную ручку. Контакт с реакционной поверхностью не допустим. Рекомендуется данные о пациенте (такие, как номер пробы) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

Отклонение от указанных времени и температуры инкубации ведет к получению ошибочных результатов.

Инкубацию с субстратом (четвертую инкубацию; см. раздел 10.9) следует проводить в темноте, чтобы избежать самопроизвольного окрашивания субстрата.

Проведение данного теста требует предварительного обучения персонала лаборатории. Пожалуйста, соблюдайте инструкции по технике безопасности при работе в медицинских лабораториях. Необходимо строго следовать инструкции по применению набора.

10.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера в мерный цилиндр на 500 мл, доведите объем до 500 мл дистиллированной водой, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в специальную емкость для промывочного буфера. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

10.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое количество реакционных кассет со стрипами и промойте их по отдельности в течение, как минимум, 5 секунд под струей из флакона-диспенсера с разведенным промывочным буфером, держа кассету наклонно. Более удобно выполнять данную операцию, используя специальный планшет, куда можно вставить одновременно до 10 кассет. Необходимо особо следить за тем, чтобы стрипы были полностью смочены буферным раствором, для чего расположите планшет с кассетами, заполненными буфером, горизонтально и осторожно встряхивайте. После этого вылейте жидкость из кассет и снова быстро промойте.

По окончании промывки удалите остатки жидкости, постукивая перевернутыми кассетами по чистому листу бумажного полотенца (фильтровальной бумаги). Внесите пипеткой в углубление каждой кассеты по 400 мкл исследуемой сыворотки пациента. Используйте для каждой сыворотки индивидуальный одноразовый наконечник! Затем инкубируйте стрипы при комнатной температуре (20-25 °C) на горизонтальном шейкере при скорости 100 – 120 качаний в минуту в течение 45 минут. Инкубацию стрипов можно проводить без шейкера, увеличив время инкубации до 1 часа. В этом случае покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.4. Промывка мембран промывочным буфером

Промойте стрипы по отдельности в течение 5 секунд под струей из флакона-диспенсера с разведенным промывочным буфером, держа кассету наклонно. Направьте струю промывочного буфера так, чтобы она прошла через стрип несколько раз. При одновременной промывке нескольких кассет, вставленных в планшет, держите его вертикально, во избежание попадания сывороток с одних кассет на другие. Дальнейшую промывку проводите в соответствии с процедурой, описанной в разделе 10.3.

10.5. Вторая инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) раствора выявляющих антител. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости приблизительно 100 – 120 качаний в минуту) в течение 45 минут при комнатной температуре, либо без шейкера в течение 1 часа при комнатной температуре. В отсутствие горизонтального шейкера покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.6. Промывка

Промойте, как описано в разделе 10.4.

10.7. Третья инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) конъюгата стрептавидина. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости приблизительно 100 – 120 качаний в минуту) либо без шейкера в течение 20 минут при комнатной температуре. В отсутствие горизонтального шейкера покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.8. Промывка

Промойте, как описано в разделе 10.4.

10.9. Четвертая инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) субстрата. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости, приблизительно, 100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в темноте в течение 20 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации остановите развитие окраски, быстро ополоснув стрипы под струей проточной водопроводной воды. После чего высушите стрипы на воздухе, или, для ускорения процесса, используя бытовой фен для сушки волос. После сушки голубовато-пурпурная окраска фона исчезает. Поэтому оценку результатов нельзя проводить до полного высыхания стрипов.

Краткая схема исследования

1. Прогрейте все реагенты до комнатной температуры.
2. Разведите концентрат промывочного буфера в соотношении 1: 25.
3. Промойте стрипы разведенным промывочным буфером.
4. Внесите по **400 мкл** каждого образца сыворотки в соответствующую реакционную кассету со стрипом и инкубируйте стрипы на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту) в течение **45 минут** при комнатной температуре, либо без шейкера (вручную) в течение 1 часа при комнатной температуре.

5. Промойте несколько раз каждый стрип, держа кассету наклонно под струей промывочного буфера из флакона-диспенсера.
6. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) выявляющих антител и инкубируйте кассеты на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту) в течение **45 минут** при комнатной температуре, либо без шейкера (вручную) в течение 1 часа при комнатной температуре.
7. Промойте, как описано в п.5.
8. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) конъюгата стрептавидина и инкубируйте кассеты на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в течение **20 минут** при комнатной температуре.
9. Промойте, как описано в п.5.
10. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) субстрата и инкубируйте кассеты в темноте на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в течение **20 минут** при комнатной температуре. Остановите реакцию, быстро ополоснув стрип под струей проточной водопроводной воды.
11. Полностью высушите стрипы и оцените полученные результаты.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в Панели А набора RIDA® AllergyScreen Panel A

В наборе RIDA® AllergyScreen Panel A стрип содержит 10 пищевых аллергенов, нанесенных в следующем порядке: лесной орех, арахис, соевые бобы, кукурузная мука, пшеничная мука, яичный белок, молоко, треска, помидоры и апельсины (последовательность расположения аллергенов на стрипе приведена на рис. 1)

Панель А (пищевые аллергены), 9 аллергенов



Рис. 1. Расположение аллергенов на стрипе в наборе RIDA® AllergyScreen Panel A.

Участок стрипа, соответствующий отрицательной контрольной полосе, не покрыт аллергенами; в качестве положительного контроля на каждый стрип нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин. Для непосредственной оценки результатов следует использовать правую часть оценочного шаблона, вкладываемого в набор.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

Оценка проводится визуально. Для каждого аллергена интенсивность окраски тестовой полосы на стрипе прямо пропорциональна содержанию соответствующего специфического IgE в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в цвете между фоном мембраны и соответствующей тестовой полосой. Если разницы с фоном нет, значит, данный тест не подтверждает наличия специфических антител к данному аллергену.

Полуколичественную оценку можно делать по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения рекомендуется использовать цветовую шкалу на вложенном в набор оценочном шаблоне.

Классы, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно преобразовать в содержание соответствующего IgE, используя таблицу 1

Таблица 1. Соотношение между классом аллергенности и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллергенспецифического IgE
0	отсутствует или обнаруживается с трудом
1	низкое
2	повышенное
3	существенно повышенное
4	высокое

11.3. Контроль качества результатов

Для проведения контроля качества каждый стрип содержит положительный и отрицательный контроли. Они используются для проверки правильности проведения теста. Если полоса положительного контроля не окрашена, тест выполнен неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Для проведения контроля качества каждый стрип содержит положительный и отрицательный контроли. Они используются для проверки правильности проведения теста. Если полоса положительного контроля не окрашена, тест выполнен неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности реагентов
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, порчи или протечки реагентов; нельзя использовать субстрат, если он приобрел голубую окраску.

Если результаты контроля качества не соответствуют требованиям и после повторной постановки анализа, обратитесь к поставщику набора.

11.4. Документирование результатов

После того, как стрипы высушены, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диагностика аллергии основывается не только на результатах лабораторных анализов. Невозможно увидеть полную картину заболевания без объединения данных анамнеза (клиническая история пациента) с данными различных лабораторных *in vivo* и *in vitro* тестов (клинический профиль пациента). При отсутствии различий между результатами *in vivo* и *in vitro* диагностики тест необходимо повторить через 3 – 4 недели.

Классы, установленные с помощью данной тест-системы, дают возможность зафиксировать степень чувствительности пациента к различным индивидуальным аллергенам.

Таким образом, обнаружение присутствия аллерген-специфических IgE-антител является существенным и практически важным дополнением к *in vivo* методам, таким как тест кожной пробы. Более того, зачастую *in vitro* исследование является единственным возможным способом идентифицировать аллергочувствительность I типа (аллергия немедленного типа).

Определение титров аллерген-специфических IgE показано при мониторинге терапевтического лечения, например методом гипосенсибилизации, или при дефиците аллергена. В этой связи сыворотки, давшие положительный результат с набором RIDASCREEN® AllergyScreen Panel A, следует исследовать повторно с помощью ИФА теста RIDASCREEN® Specific IgE (кат. № A0249), чтобы получить количественные значения. Важным дополнением к определению IgE может служить параллельное количественное определение специфических IgG (ИФА набором RIDASCREEN® Specific IgG, кат. № A0629) – особенно, в случаях пищевой и респираторной аллергии (например, при таких аллергических синдромах, как «легкие любителя птиц», «астма пекаря» и т.п.).

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Средний коэффициент вариации в серии: 6,2 %
Средний коэффициент вариации между сериями: 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro* тест-системы для определения IgE. Результаты сравнивали с результатами исследования набором RIDA® AllergyScreen Panel A. Получено:

чувствительность: 84,3 %
специфичность: 95,0 %
точность: 90,6 %

Подобное же сравнение было проведено между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами исследования набором RIDA® AllergyScreen Panel A. Получено:

чувствительность: 95,1 %
специфичность: 80,2 %
точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель B
(RIDA® AllergyScreen Panel B)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® AllergyScreen Panel B (респираторные аллергены)

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для полуколичественного определения *in vitro* циркулирующих аллерген-специфических иммуноглобулинов класса E (IgE) в сыворотке крови человека.

2. ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины класса E впервые были обнаружены в 1964 г. и играют важную роль в запуске аллергических реакций 1 типа.

В-лимфоциты после трансформации в так называемые плазматические клетки выделяют антитела разных классов, которые циркулируют в кровяном русле и отвечают за гуморальный иммунитет.

Преобразование В-лимфоцитов в секретирующие антитела плазматические клетки регулируется Т-хелперами и Т-суппрессорами (подклассы Т-лимфоцитов). Если такая регуляция теряется, преобразование В-лимфоцитов начинает происходить под действием безвредных в нормальных условиях антигенов. Образовавшиеся в таком случае плазматические клетки будут преимущественно продуцировать антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса E.

Эти иммуноглобулины мигрируют с током крови к базофильным гранулоцитам и тучным клеткам, где они связываются со специфическими рецепторами своими Fc-участками. Если организм продолжает контактировать со специфическим аллергеном, тогда этот аллерген будет мигрировать непосредственно к IgE-антителам, прикрепленным к рецепторам, и связываться своими эпитопами с fab-фрагментами двух соседних молекул IgE, специфичных к данному аллергену. Образование этой связи приводит к высвобождению из тучных клеток различных вазоактивных аминов, в особенности к высвобождению гистамина, который вместе с другими высокоактивными медиаторами может вызывать типичные симптомы аллергической реакции 1 типа, такие как чувство жжения, крапивница или аллергическая сыпь, дерматиты, аллергический ринит, сенная лихорадка, астма и анафилактический шок.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel B основан на принципе иммуноблотинга. Индивидуальные аллергены иммобилизованы на поверхности нитроцеллюлозной мембраны (стрипа), закрепленной на дне пластиковой реакционной кассеты. Сыворотки пациентов вносят в углубление кассеты и инкубируют при комнатной температуре. При этом специфические IgE-антитела взаимодействуют с соответствующими иммобилизованными аллергенами и связываются таким образом с нитроцеллюлозной мембраной. Не связанный материал удаляют промывкой. После этого добавляют антитела к IgE человека, конъюгированные с биотином (выявляющие антитела), и проводят инкубацию при комнатной температуре. Выявляющие антитела образуют комплексы со специфическими IgE в тестовых зонах нитроцеллюлозного

стрипа. Избыток не связанных выявляющих антител удаляют промывкой. Затем добавляют стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и инкубируют при комнатной температуре. Конъюгат стрептавидина связывается с биотином в тестовых зонах, а также в зоне положительного контроля. Избыток несвязанного конъюгата стрептавидина удаляют промывкой. При добавлении субстрата и инкубации при комнатной температуре происходит цветная ферментативная реакция щелочной фосфатазы, приводящая к появлению окрашенных полос в тестовых зонах. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна содержанию специфических антител в исследуемом образце сыворотки. Полуколичественная оценка результата реакции производится (после полного высыхания стрипа) по специальному цветовому шаблону, вкладываемому в набор.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Одна упаковка набора RIDA® AllergyScreen Panel B (9 респираторных аллергенов) содержит:

Membrane	Тестовые стрипы: в индивидуальных реакционных кассетах; полоски нитроцеллюлозной мембраны с нанесенными аллергенами (9 тестовых полос)	10 опред.
Wash	Промывочный буфер: 25x концентрат; Трис / NaCl, содержит 0,1 % NaN ₃ ; при разведении дает 1 × 500 мл промывочного буфера; pH 7,5	1 × 20 мл
Antibody	Выявляющие антитела: биотинилированные антитела козы к IgE человека; содержит 0,1 % NaN ₃ ; готов к использованию	1 × 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02 % метилизотиазолинола и 0,02 % бромнитродексана; готов к использованию	1 × 4 мл
Substrate	Субстратный раствор: BCIP / NTB (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой); готов к использованию	1 × 4 мл
	Оценочный шаблон: слева: цветная шкала, соответствующая классам 0-4; справа: расположение аллергенов на В	1
	Инструкция по применению	

5. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Вортекс
- Мерный цилиндр объемом 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 400 мкл
- Лабораторный флакон-диспенсер для буфера объемом 500 мл
- Промывочный планшет для 10 реакционных кассет (не обязательно)
- Светозащитный пенал для проведения инкубации в условиях темноты (полную систему, состоящую из промывочного планшета и пенала для инкубации, можно приобрести у R-Biopharm)
- Горизонтальный шейкер (не обязательно)
- Бытовой фен для сушки волос (не обязательно)

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор RIDA® AllergyScreen Panel B предназначен для *in vitro* определения антител к специфическим IgE в сыворотке крови человека. Поэтому исследуемые образцы следует считать потенциально инфицированными и обращаться с ними, соблюдая необходимые меры предосторожности.
- Выявляющие антитела и концентрат промывочного буфера набора RIDA® AllergyScreen Panel B содержат в качестве консерванта азид натрия. Не допускайте попадания этих растворов на кожу или слизистые. Следует учитывать, что при контакте этих растворов со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.
- Конъюгат стрептавидина RIDA® AllergyScreen Panel B содержит в качестве консерванта субтоксические концентрации метилизотиазолинола и бромнитродексана.
- После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.
- Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, должны быть обработаны соответствующими дезинфицирующими средствами или автоклавированы при 121 °C, по меньшей мере, в течение одного часа.
- Не допускается замена или использование отдельных компонентов из наборов других серий.

- В случае повреждения наружной упаковки вложенные в нее отдельные компоненты набора можно использовать только вместе. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена индивидуальная упаковка или протекли флаконы.

7. ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Тест необходимо открывать непосредственно перед проведением анализа. После забора крови во избежание гемолиза сыворотку от сгустка следует отделять как можно быстрее. Образцы до анализа следует хранить охлажденными при температуре 2-8 °C или замороженными. Не допускайте повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инаktivированных прогреванием, липемических, гемолизированных, иктерических или мутных может привести к получению ложных результатов.

Неразведенная сыворотка	
2-8 °C	-20 °C
1 неделя	более 1 недели

Кассеты со стрипами необходимо хранить в плотно закрытой пластиковой упаковке в сухом, темном, прохладном месте. Все реагенты следует хранить при 2-8 °C и использовать до срока годности, указанного на этикетке. Микробная контаминация должна быть исключена. После истечения срока годности качество набора не гарантируется. Разведенный промывочный буфер может храниться до 4 недель при температуре 2-8 °C.

Контаминация субстратного раствора и конъюгата стрептавидина должна быть полностью исключена, поскольку она приводит к окрашиванию субстрата. Следует также предохранять субстрат от воздействия прямых солнечных лучей, во избежание его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

8. ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ПОРЧИ РЕАГЕНТОВ

Помутнение или голубоватое окрашивание субстрата, появившееся при хранении, указывает на порчу этого реагента.

9. ВЗЯТИЕ И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Набор RIDA® AllergyScreen Panel B был разработан для анализа сыворотки крови человека. Образцы крови следует собирать методом венопункции и, после коагуляции в течение 30–40 минут, отделять сыворотку центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g. Необходимо полностью исключить повторное замораживание, а также микробную контаминацию образцов. Использование образцов, инаktivированных прогреванием, равно как гемолизированных, липемических, иктерических или мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

При невозможности немедленного исследования, образцы можно хранить до 1 недели при 2-8 °C. Более длительное хранение допускается в замороженном состоянии при температуре –20 °C и ниже.

10. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

10.1. Общие замечания

Перед постановкой исследования доведите температуру всех реагентов и кассет со стрипами до комнатной. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. Воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования, соблюдения времени и температуры инкубации, тщательности и единообразия промывки стрипов. Не проводите тест на прямом солнечном свете. Для того, чтобы избежать потерь жидкости за счет испарения, рекомендуется закрывать кассету во время инкубации. Кассету следует брать только за специальную ручку. Контакт с реакционной поверхностью не допустим. Рекомендуется данные о пациенте (такие, как номер пробы) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

Отклонение от указанных времени и температуры инкубации ведет к получению ошибочных результатов.

Инкубацию с субстратом (четвертую инкубацию; см. раздел 10.9) следует проводить в темноте, чтобы избежать самопроизвольного окрашивания субстрата.

Проведение данного теста требует предварительного обучения персонала лаборатории. Пожалуйста, соблюдайте инструкции по технике безопасности при работе в медицинских лабораториях. Необходимо строго следовать инструкции по применению набора.

10.2. Приготовление промывочного буфера

Перенесите содержимое 1 флакона с концентратом промывочного буфера в мерный цилиндр на 500 мл, доведите объем до 500 мл дистиллированной водой, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в специальную емкость для промывочного буфера. Если в концентрате присутствуют кристаллы солей, растворите их предварительно путем прогрева концентрата на водяной бане при 37 °C.

10.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое количество реакционных кассет со стрипами и промойте их по отдельности в течение, как минимум, 5 секунд под струей из флакона-диспенсера с разведенным промывочным буфером, держа кассеты наклонно. Более удобно выполнять данную операцию, используя специальный планшет, куда можно вставить одновременно до 10 кассет. Необходимо особо следить за тем, чтобы стрипы были полностью смочены буферным раствором, для чего расположите планшет с кассетами, заполненными буфером, горизонтально и осторожно встряхивайте. После этого вылейте жидкость из кассет и снова быстро промойте.

По окончании промывки удалите остатки жидкости, постукивая перевернутыми кассетами по чистому листу бумажного полотенца (фильтровальной бумаги). Внесите пипеткой в углубление каждой кассеты по 400 мкл исследуемой сыворотки пациента. Используйте для каждой сыворотки индивидуальный одноразовый наконечник! Затем инкубируйте стрипы при комнатной температуре (20-25 °C) на горизонтальном шейкере при скорости 100 – 120 качаний в минуту в течение 45 минут. Инкубацию стрипов можно проводить без шейкера, увеличив время инкубации до 1 часа. В этом случае покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.4. Промывка мембран промывочным буфером

Промойте стрипы по отдельности в течение 5 секунд под струей из флакона-диспенсера с разведенным промывочным буфером, держа кассету наклонно. Направьте струю промывочного буфера так, чтобы она прошла через стрип несколько раз. При одновременной промывке нескольких кассет, вставленных в планшет, держите его вертикально, во избежание попадания сывороток с одних кассет на другие. Дальнейшую промывку проводите в соответствии с процедурой, описанной в разделе 10.3.

10.5. Вторая инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) раствора выявляющих антител. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости приблизительно 100 – 120 качаний в минуту) в течение 45 минут при комнатной температуре, либо без шейкера в течение 1 часа при комнатной температуре. В отсутствие горизонтального шейкера покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.6. Промывка

Промойте, как описано в разделе 10.4.

10.7. Третья инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) конъюгата стрептавидина. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости приблизительно 100 – 120 качаний в минуту) либо без шейкера в течение 20 минут при комнатной температуре. В отсутствие горизонтального шейкера покачивание кассет со стрипами следует выполнять вручную.

10.8. Промывка

Промойте, как описано в разделе 10.4.

10.9. Четвертая инкубация

Внесите в углубление каждой кассеты по 8 капель (около 400 мкл) субстрата. Инкубируйте на горизонтальном шейкере (при скорости, приблизительно, 100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в темноте в течение 20 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации остановите развитие окраски, быстро ополоснув стрипы под струей проточной водопроводной воды. После чего высушите стрипы на воздухе, или, для ускорения процесса, используя бытовой фен для сушки волос. После сушки голубовато-пурпурная окраска фона исчезает. Поэтому оценку результатов нельзя проводить до полного высыхания стрипов.

Краткая схема исследования

1. Прогрейте все реагенты до комнатной температуры.
2. Разведите концентрат промывочного буфера в соотношении 1: 25.
3. Промойте стрипы разведенным промывочным буфером.
4. Внесите по **400 мкл** каждого образца сыворотки в соответствующую реакционную кассету со стрипом и инкубируйте стрипы на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту) в течение **45 минут** при комнатной температуре, либо без шейкера (вручную) в течение 1 часа при комнатной температуре.

5. Промойте несколько раз каждый стрип, держа кассету наклонно под струей промывочного буфера из флакона-диспенсера.
6. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) выявляющих антител и инкубируйте кассеты на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту) в течение **45 минут** при комнатной температуре, либо без шейкера (вручную) в течение 1 часа при комнатной температуре.
7. Промойте, как описано в п.5.
8. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) конъюгата стрептавидина и инкубируйте кассеты на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в течение **20 минут** при комнатной температуре.
9. Промойте, как описано в п.5.
10. Внесите в углубление каждой реакционной кассеты по 8 капель (около **400 мкл**) субстрата и инкубируйте кассеты в темноте на горизонтальном шейкере (100 – 120 качаний в минуту), или покачивая вручную, в течение **20 минут** при комнатной температуре. Остановите реакцию, быстро ополоснув стрип под струей проточной водопроводной воды.
11. Полностью высушите стрипы и оцените полученные результаты.

11. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в Панели В набора RIDA® AllergyScreen Panel B (респираторные аллергены)

В наборе RIDA® AllergyScreen Панель В стрип содержит 9 респираторных аллергенов, нанесенных в следующем порядке: клещ домашней пыли I (*Dermatophagoides pteronyssinus*), клещ домашней пыли II (*Dermatophagoides farinae*), береза, тимopheевка, рожь (пыльца), полынь, кошка (эпителлий), собака (эпителлий) и *Alternaria alternata*, (последовательность расположения аллергенов на стрипе приведена на рис. 1).

Панель В (респираторные аллергены), 9 аллергенов

	клещ <i>Derm. Pteronyssinus</i>
	клещ <i>Derm. Farinae</i>
	береза
	тимopheевка луговая
	рожь
	полынь
	кошка
	собака
	<i>Alternaria alternata</i>
	положительный контроль
	отрицательный контроль

Рис. 1. Расположение аллергенов на стрипе в наборе RIDA® AllergyScreen Panel B

Участок стрипа, соответствующий отрицательной контрольной полосе, не покрыт аллергенами; в качестве положительного контроля на каждый стрип нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин. Для непосредственной оценки результатов следует использовать правую часть оценочного шаблона, вкладываемого в набор (соответственно, для панели A или панели B).

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

Оценка проводится визуально. Для каждого аллергена интенсивность окраски тестовой полосы на стрипе прямо пропорциональна содержанию соответствующего специфического IgE в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в цвете между фоном мембраны и соответствующей тестовой полосой. Если разницы с фоном нет, значит, данный тест не подтверждает наличия специфических антител к данному аллергену.

Полуколичественную оценку можно делать по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения рекомендуется использовать цветовую шкалу на вложенном в набор оценочном шаблоне.

Классы, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно преобразовать в содержание соответствующего IgE, используя таблицу 1

Таблица 1. Соотношение между классом аллергенности и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллергенспецифического IgE
0	отсутствует или обнаруживается с трудом
1	низкое
2	повышенное
3	существенно повышенное
4	высокое

11.3. Контроль качества результатов

Для проведения контроля качества каждый стрип содержит положительный и отрицательный контроли. Они используются для проверки правильности проведения теста. Если полоса положительного контроля не окрашена, тест выполнен неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Для проведения контроля качества каждый стрип содержит положительный и отрицательный контроли. Они используются для проверки правильности проведения теста. Если полоса положительного контроля не окрашена, тест выполнен неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- срок годности реагентов
- правильность постановки анализа
- визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации, порчи или протечки реагентов; нельзя использовать субстрат, если он приобрел голубую окраску.

Если результаты контроля качества не соответствуют требованиям и после повторной постановки анализа, обратитесь к поставщику набора.

11.4. Документирование результатов

После того, как стрипы высушены, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

12. ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ АНАЛИЗА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диагностика аллергии основывается не только на результатах лабораторных анализов. Невозможно увидеть полную картину заболевания без объединения данных анамнеза (клиническая история пациента) с данными различных лабораторных *in vivo* и *in vitro* тестов (клинический профиль пациента). При отсутствии различий между результатами *in vivo* и *in vitro* диагностики тест необходимо повторить через 3 – 4 недели.

Классы, установленные с помощью данной тест-системы, дают возможность зафиксировать степень чувствительности пациента к различным индивидуальным аллергенам.

Таким образом, обнаружение присутствия аллерген-специфических IgE-антител является существенным и практически важным дополнением к *in vivo* методам, таким как тест кожной пробы. Более того, зачастую *in vitro* исследование является единственным возможным способом идентифицировать аллергическую чувствительность I типа (аллергия немедленного типа).

Определение титров аллерген-специфических IgE показано при мониторинге терапевтического лечения, например методом гипосенсибилизации, или при дефиците аллергена. В этой связи сыворотки, давшие положительный результат с набором RIDASCREEN® AllergyScreen Panel B, следует исследовать повторно с помощью ИФА теста RIDASCREEN® Specific IgE (кат. № A0249), чтобы получить количественные значения. Важным дополнением к определению IgE может служить параллельное количественное определение специфических IgG (ИФА набором RIDASCREEN® Specific IgG, кат. № A0629) – особенно, в случаях пищевой и респираторной аллергии (например, при таких аллергических синдромах, как «легкие любителя птиц», «астма пекаря» и т.п.).

13. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Средний коэффициент вариации в серии: 6,2 %
Средний коэффициент вариации между сериями: 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro* тест-системы для определения IgE. Результаты сравнивали с результатами исследования набором RIDA® AllergyScreen Panel B. Получено:

чувствительность: 84,3 %
специфичность: 95,0 %
точность: 90,6 %

Подобное же сравнение было проведено между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами исследования набором RIDA® AllergyScreen. Получено:

чувствительность: 95,1 %
специфичность: 80,2 %
точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью ⚡ листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель 1
(RIDA® AllergyScreen Panel 1)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® AllergyScreen Panel 1

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для *in vitro* диагностики. Он представляет собой тест для полуколичественного определения специфических IgE-антител к панели индивидуальных аллергенов в сыворотке крови человека методом иммуноблота.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса Е (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии. Когда имеется аллергическая реакция, аллергены, вызвавшие ее, могут быть установлены определением специфических IgE-антител в сыворотке крови. Данный метод может использоваться также для выявления сенситизации организма, не сопровождающейся видимыми симптомами.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 1 основан на принципе иммуноблотинга. Специфические аллергены, нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стрипов). Специфичные к этим аллергенам IgE-антитела, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP / NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® X-Screen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Membrane	Тестовые стрипы AllergyScreen: полоски нитроцеллюлозной мембраны, покрытые материалом аллергенов в виде 20 тест-полос на каждом стрипе; каждая полоска заключена в пластиковую кассету	10 стрипов
Wash	Промывочный буфер: 25x концентрат; Трис / NaCl, содержит 0,1% NaN ₃	1 x 20 мл
Antibody	Проявляющие антитела: раствор биотинилированных поликлональных антител козы к IgE человека; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	1 x 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромнитродексана; готов к использованию	1 x 4 мл
Substrate	Субстрат: BCIP / NBT (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой)	1 x 4 мл
	Оценочный шаблон с цветовой шкалой	
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Тестовые стрипы необходимо хранить закрытыми в пластиковую упаковку в сухом, темном и прохладном месте. Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С, после вскрытия набора его можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер имеет срок годности 4 недели (температура хранения 2-8 °С). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1 Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2 Оборудование

- Вортекс
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 250 мкл
- Бутыль для промывочного буфера (на 500 мл)
- Держатель для 10 тестовых стрипов (необязательно) – устройство для удобства промывки и инкубации
- Инкубатор для проведения инкубации в условиях темноты (у фирмы R-Biopharm можно заказать полную систему, состоящую из держателя и инкубатора)
- Шейкер рокерного типа.
- Обычный фен для сушки волос, имеющийся в продаже (необязательно)
- Планшетный фотометр (RIDA® X-Screen), вместе с программным обеспечением и персональным компьютером с USB-портом (по дополнительному заказу)
- Планшетный фотометр (RIDA® maXi-Screen), вместе с программным обеспечением и экраном (по дополнительному заказу)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор теста RIDA® AllergyScreen Panel 1 используется только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Проявляющие антитела и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте

растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Конъюгат содержит метилизотиазолон и бромнитродексан в субтоксических концентрациях в качестве консерванта.

В случае повреждения наружной упаковки, перед тем как использовать компоненты набора, необходимо убедиться в их исправности. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена их индивидуальная упаковка или если кассеты со стрипами не были запечатаны.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 1 был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием все реагенты, сыворотки пациентов и кассеты с тестовыми стрипами необходимо прогреть до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор следует немедленно поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Тестовые стрипы нельзя использовать более одного раза. Реагенты и тестовые стрипы нельзя использовать, если упаковка нарушена или кассеты со стрипами не запечатаны.

Нельзя комбинировать компоненты из наборов разных серий или заменять какой-либо компонент на аналогичный из другой серии.

Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от соблюдения рекомендуемых времени и температуры инкубации, а также единообразия выполнения стадии промывки тестовых стрипов.

Не проводите тест в прямом солнечном свете. Кассету следует брать только за специальную ручку, не дотрагиваясь руками до реакционной поверхности стрипа. Рекомендуется данные о пациенте (такие как номер, присвоенный в лаборатории) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Приготовьте рабочее разведение промывочного буфера из одного флакона концентрата **Wash**, доведя объем дистиллированной водой в мерном цилиндре до 500 мл, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в лабораторную бутылку для промывочного буфера. Если в концентрате **Wash** присутствуют кристаллы солей, растворите их, предварительно прогрев концентрат на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое для проведения анализа количество стрипов **Membrane** и промойте их по отдельности в течение 5 секунд под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером. Данный процесс можно упростить, используя специальное приспособление-держатель **Membrane**, в которое можно вставить до 10 стрипов. Добейтесь, чтобы промывочный буфер полностью смачивал стрипы. Проще всего это сделать, поместив держатель в горизонтальное положение и, после заполнения стрипов буфером, покачать несколько раз держатель вперед-назад. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane**, снова быстро промойте достаточным количеством разведенного промывочного буфера и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала (бумажного полотенца или фильтровальной бумаги). Затем внесите в каждый стрип **Membrane** по 250 мкл исследуемой сыворотки пациента и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.4. Промывка

Промывайте тестовые стрипы **Membrane** под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. Держите стрипы **Membrane** вертикально, верхним концом вниз, чтобы избежать попадания сыворотки на соседние тестовые стрипы. Промывайте каждый тестовый стрип несколько раз, каждый раз вытряхивая буфер. Затем заполните стрипы **Membrane** разведенным промывочным буфером и покачайте несколько раз вперед-назад. Затем, придерживая перевернутые тестовые стрипы **Membrane** наклонно, ополаскивайте их из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane** и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) проявляющих антител **Antibody**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.6. Промывка

См. раздел 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 20 минут.

9.8. Промывка

См. раздел 9.4.

9.9. Четвертая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) только на шейкере рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в темноте в течение 20 минут.

По окончании инкубации остановите развитие цветной реакции интенсивным промыванием стрипов **Membrane** проточной водопроводной водой. Затем стрипы высушите на воздухе или используйте для ускорения процесса сушки обычный фен для волос. В результате высушивания сине-сиреневое окрашивание фона исчезает. Поэтому оценку результатов на тестовых стрипах **Membrane** нельзя проводить до полного высушивания.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА ИСТЕЧЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Тест выполнен правильно, если фон отсутствует, а положительный контроль дает хорошо окрашенную полосу.

Если ожидаемые значения не укладываются в полученные результаты или если реагент мутный или если раствор субстрата приобрел синюю окраску до того, как его добавили к тестовым стрипам, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек.

Если вы не получили предусмотренные результаты, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка)
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в панели 1 набора RIDA® AllergyScreen Panel 1:

	Положительный контроль
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. farinae</i>
	Ольха
	Береза
	Лещина
	Смесь трав
	Рожь (пыльца)
	Полынь
	Подорожник
	Кошка
	Лошадь
	Собака
	<i>Alternaria alternata</i>
	Яичный белок
	Молоко
	Арахис
	Лесной орех
	Морковь
	Пшеничная мука
	Соевые бобы

Информация о конфигурации стрипов имеется в виде приложений на домашней странице компании R-Biopharm AG.

В качестве положительного контроля в конце каждого стрипа нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

11.2.1. Визуальная оценка

Интенсивность окрашивания полос на тестовом стрипе прямо пропорциональна количеству соответствующих специфических IgE к аллергенам в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в насыщенности цветом фона мембраны и полосы в месте расположения соответствующего аллергена. Если разницы с фоном нет, значит данный тест RIDA® AllergyScreen Panel 1 не подтверждает наличия специфических IgE-антител к этому аллергену.

Полуколичественную оценку можно проводить визуально по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения предлагается использование цветной шкалы (в левой части прилагаемого оценочного шаблона).

Классы аллергореактивности, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно соотнести с содержанием соответствующих IgE, используя таблицу 3.

Таблица 3. Соотношение между определяемыми классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом
1	Низкое
2	Увеличенное
3	Существенно увеличенное
4	Высокое

11.2.2. Количественная оценка с использованием прибора RIDA® X Screen

Для количественной оценки тестовые стрипы вставляют в держатель и считывают результат на приборе RIDA® X-Screen, используя соответствующее программное обеспечение. По измеренным значениям автоматически рассчитывается концентрация аллерген-специфических IgE в каждой полосе в МЕ/мл и назначаются классы аллергореактивности от 0 до 6. Оценка производится автоматически по стандартной кривой, хранящейся в программе оценки.

Начиная измерение, внимательно следите за тем, чтобы использовать нужный предустановленный тест (зависит от панели аллергенов).

Используя таблицу 4, по концентрации или классу, соответствующему этой концентрации, можно определить титр аллерген-специфических IgE.

Таблица 4. Соотношение между концентрациями в МЕ/мл, классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	Отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	Низкое
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	Увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	Существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	Высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	Очень высокое
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	Чрезвычайно высокое

11.3. Контроль качества результатов

Положительный контроль включен в каждый тестовый стрип. Он используется для проверки правильности проведения теста.

Подсчет с использованием прибора RIDA® X Screen

Если значение класса для положительного контроля < 2,5, тест считается проведенным неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Если полоса положительного контроля не окрашена, тест считается проведенным неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка) – проверяется только при полуколичественной оценке
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11.4. Документирование результатов

После того, как тестовые стрипы высушены и исследованы на приборе RIDA® X-Screen или визуально, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

Данные измерения (фотография стрипа и ее оценка) заносятся на твердый диск персонального компьютера в заранее выбранную директорию. Распечатка данных по каждой исследованной сыворотке может быть сделана с любого стандартного принтера, соединенного с персональным компьютером.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgE, измеренные с использованием данной тест-системы, дают возможность получить лишь некоторое представление о степени сенсилизации пациента к индивидуальным аллергенам или смеси тестируемых аллергенов.

Они не могут быть использованы для выведения соотношения определяемой концентрации IgE и наличия серьезных клинических симптомов. Полученные результаты всегда следует интерпретировать с учетом полной клинической картины заболевания.

В связи с отсутствием национальных и международных стандартов и возможными различиями в растворах тестов кожной пробы и экстрактов аллергенов, используемых в тестах *in vitro*, возможны несоответствия результатов тестов *in vivo* и *in vitro*. Титры IgE, измеренные непосредственно после появления анафилактических реакций, могут быть отрицательными или слишком низкими. В случае такого несоответствия результатов диагностики *in vitro* и *in vivo* тест следует повторить спустя 3 - 4 недели. Случаи несоответствия должны быть исследованы специалистом-аллергологом иными *in vivo* методами, такими как провокационные тесты. Следует учесть, что эти тесты могут вызывать анафилактический шок.

Ложноположительные результаты теста могут быть получены при наличии перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вариабельность внутри одного исследования: средняя 6,2 %

Вариабельность между различными исследованиями: средняя 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro*-системы определения IgE. Результаты сравнивали с результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 1. Подобное сравнение было проведено и между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 1.

Результаты сравнения с количественной референтной системой:

Чувствительность: 84,3 %

Специфичность: 95,0 %

Точность: 90,6 %

Результаты сравнения с тестами кожной пробы:

Чувствительность: 95,1 %

Специфичность: 80,2 %

Точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель 2

(RIDA® AllergyScreen Panel 2)

производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® AllergyScreen Panel 2

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений (респираторные аллергены)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для *in vitro* диагностики. Он представляет собой тест для полуколичественного определения специфических IgE-антител к панели респираторных аллергенов в сыворотке крови человека методом иммуноблота.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии. Когда имеется аллергическая реакция, аллергены, вызвавшие ее, могут быть установлены определением специфических IgE-антител в сыворотке крови. Данный метод может использоваться также для выявления сенсибилизации организма, не сопровождающейся видимыми симптомами.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 2 основан на принципе иммуноблотинга. Специфические респираторные аллергены, нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стрипов). Специфичные к этим аллергенам IgE-антитела, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP / NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® X-Screen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Membrane	Тестовые стрипы AllergyScreen: полоски нитроцеллюлозной мембраны, покрытые материалом аллергенов в виде 20 тест-полос на каждом стрипе; каждая полоска заключена в пластиковую кассету	10 стрипов
Wash	Промывочный буфер: 25х концентрат; Трис / NaCl, содержит 0,1% NaN ₃	1 x 20 мл
Antibody	Проявляющие антитела: раствор биотинилированных поликлональных антител козы к IgE человека; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	1 x 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромнитродексана; готов к использованию	1 x 4 мл
Substrate	Субстрат: BCIP / NBT (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой)	1 x 4 мл
	Оценочный шаблон с цветовой шкалой	
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Тестовые стрипы необходимо хранить закрытыми в пластиковую упаковку в сухом, темном и прохладном месте. Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С, после вскрытия набора его можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер имеет срок годности 4 недели (температура хранения 2-8 °С). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1 Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2 Оборудование

- Вортекс
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 250 мкл
- Бутыль для промывочного буфера (на 500 мл)
- Держатель для 10 тестовых стрипов (необязательно) – устройство для удобства промывки и инкубации
- Инкубатор для проведения инкубации в условиях темноты (у фирмы R-Biopharm можно заказать полную систему, состоящую из держателя и инкубатора)
- Шейкер рокерного типа.
- Обычный фен для сушки волос, имеющийся в продаже (необязательно)
- Планшетный фотометр (RIDA® X-Screen), вместе с программным обеспечением и персональным компьютером с USB-портом (по дополнительному заказу)
- Планшетный фотометр (RIDA® maXi-Screen), вместе с программным обеспечением и экраном (по дополнительному заказу)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор теста RIDA® AllergyScreen Panel 2 используется только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Проявляющие антитела и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Конъюгат содержит метилизотиазолон и бромнитродексан в субтоксических концентрациях в качестве консерванта.

В случае повреждения наружной упаковки, перед тем как использовать компоненты набора, необходимо убедиться в их исправности. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена их индивидуальная упаковка или если кассеты со стрипами не были запечатаны.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 2 был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием все реагенты, сыворотки пациентов и кассеты с тестовыми стрипами необходимо прогреть до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор следует немедленно поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Тестовые стрипы нельзя использовать более одного раза. Реагенты и тестовые стрипы нельзя использовать, если упаковка нарушена или кассеты со стрипами не запечатаны.

Нельзя комбинировать компоненты из наборов разных серий или заменять какой-либо компонент на аналогичный из другой серии.

Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от соблюдения рекомендуемых времени и температуры инкубации, а также единообразия выполнения стадии промывки тестовых стрипов.

Не проводите тест в прямом солнечном свете. Кассету следует брать только за специальную ручку, не дотрагиваясь руками до реакционной поверхности стрипа. Рекомендуется данные о пациенте (такие как номер, присвоенный в лаборатории) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Приготовьте рабочее разведение промывочного буфера из одного флакона концентрата **Wash**, доведя объем дистиллированной водой в мерном цилиндре до 500 мл, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в лабораторную бутылку для промывочного буфера. Если в концентрате **Wash** присутствуют кристаллы солей, растворите их, предварительно прогрев концентрат на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое для проведения анализа количество стрипов **Membrane** и промойте их по отдельности в течение 5 секунд под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером. Данный процесс можно упростить, используя специальное приспособление-держатель **Membrane**, в которое можно вставить до 10 стрипов. Добейтесь, чтобы промывочный буфер полностью смачивал стрипы. Проще всего это сделать, поместив держатель в горизонтальное положение и, после заполнения стрипов буфером, покачать несколько раз держатель вперед-назад. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane**, снова быстро промойте достаточным количеством разведенного промывочного буфера и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала (бумажного полотенца или фильтровальной бумаги). Затем внесите в каждый стрип **Membrane** по 250 мкл исследуемой сыворотки пациента и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.4. Промывка

Промывайте тестовые стрипы **Membrane** под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. Держите стрипы **Membrane** вертикально, верхним концом вниз, чтобы избежать попадания

сыворотки на соседние тестовые стрипы. Промывайте каждый тестовый стрип несколько раз, каждый раз вытряхивая буфер. Затем заполните стрипы **Membrane** разведенным промывочным буфером и покачайте несколько раз вперед-назад. Затем, придерживая перевернутые тестовые стрипы **Membrane** наклонно, ополаскивайте их из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane** и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) проявляющих антител **Antibody**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.6. Промывка

См. раздел 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 20 минут.

9.8. Промывка

См. раздел 9.4.

9.9. Четвертая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) только на шейкере рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в темноте в течение 20 минут.

По окончании инкубации остановите развитие цветной реакции интенсивным промыванием стрипов **Membrane** проточной водопроводной водой. Затем стрипы высушите на воздухе или используйте для ускорения процесса сушки обычный фен для волос. В результате высушивания сине-сиреневое окрашивание фона исчезает. Поэтому оценку результатов на тестовых стрипах **Membrane** нельзя проводить до полного высушивания.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА ИСТЕЧЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Тест выполнен правильно, если фон отсутствует, а положительный контроль дает хорошо окрашенную полосу.

Если ожидаемые значения не укладываются в полученные результаты или если реагент мутный или если раствор субстрата приобрел синюю окраску до того, как его добавили к тестовым стрипам, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек.

Если вы не получили предусмотренные результаты, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка)
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в панели 2 набора RIDA® AllergyScreen Panel 2:

	Положительный контроль
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. farinae</i>
	Ольха
	Береза
	Лещина
	Дуб
	Смесь трав
	Рожь (пыльца)
	Полынь
	Подорожник
	Кошка
	Лошадь
	Собака
	Морская свинка
	Хомячок
	Кролик
	<i>Penicillium notatum</i>
	<i>Cladospor. herbarum</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	<i>Alternaria alternata</i>

Информация о конфигурации стрипов имеется в виде приложений на домашней странице компании R-Biopharm AG.

В качестве положительного контроля в конце каждого стрипа нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

11.2.1. Визуальная оценка

Интенсивность окрашивания полос на тестовом стрипе прямо пропорциональна количеству соответствующих специфических IgE к аллергенам в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в насыщенности цветом фона мембраны и полосы в месте расположения соответствующего аллергена. Если разницы с фоном нет, значит тест RIDA® AllergyScreen Panel 2 не подтверждает наличия специфических IgE-антител к этому аллергену.

Полуколичественную оценку можно проводить визуально по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения предлагается использование цветной шкалы (в левой части прилагаемого оценочного шаблона).

Классы аллергореактивности, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно соотнести с содержанием соответствующих IgE, используя таблицу 3.

Таблица 3. Соотношение между определяемыми классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом
1	Низкое
2	Увеличенное
3	Существенно увеличенное
4	Высокое

11.2.2. Количественная оценка с использованием прибора RIDA® X Screen

Для количественной оценки тестовые стрипы вставляют в держатель и считывают результат на приборе RIDA® X-Screen, используя соответствующее программное обеспечение. По измеренным значениям автоматически рассчитывается концентрация аллерген-специфических IgE в каждой полосе в МЕ/мл и назначаются классы аллергореактивности от 0 до 6. Оценка производится автоматически по стандартной кривой, хранящейся в программе оценки.

Начиная измерение, внимательно следите за тем, чтобы использовать нужный предустановленный тест (зависит от панели аллергенов).

Используя таблицу 4, по концентрации или классу, соответствующему этой концентрации, можно определить титр аллерген-специфических IgE.

Таблица 4. Соотношение между концентрациями в МЕ/мл, классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	Отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	Низкое
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	Увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	Существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	Высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	Очень высокое
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	Чрезвычайно высокое

11.3. Контроль качества результатов

Положительный контроль включен в каждый тестовый стрип. Он используется для проверки правильности проведения теста.

Подсчет с использованием прибора RIDA® X Screen

Если значение класса для положительного контроля < 2,5, тест считается проведенным неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Если полоса положительного контроля не окрашена, тест считается проведенным неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка) – проверяется только при полуколичественной оценке
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11.4. Документирование результатов

После того, как тестовые стрипы высушены и исследованы на приборе RIDA® X-Screen или визуально, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

Данные измерения (фотография стрипа и ее оценка) заносятся на твердый диск персонального компьютера в заранее выбранную директорию. Распечатка данных по каждой исследованной сыворотке может быть сделана с любого стандартного принтера, соединенного с персональным компьютером.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgE, измеренные с использованием данной тест-системы, дают возможность получить лишь некоторое представление о степени сенсилизации пациента к индивидуальным аллергенам или смеси тестируемых аллергенов.

Они не могут быть использованы для выведения соотношения определяемой концентрации IgE и наличия серьезных клинических симптомов. Полученные результаты всегда следует интерпретировать с учетом полной клинической картины заболевания.

В связи с отсутствием национальных и международных стандартов и возможными различиями в растворах тестов кожной пробы и экстрактов аллергенов, используемых в тестах *in vitro*, возможны несоответствия результатов тестов *in vivo* и *in vitro*. Титры IgE, измеренные непосредственно после появления анафилактических реакций, могут быть отрицательными или слишком низкими. В случае такого несоответствия результатов диагностики *in vitro* и *in vivo* тест следует повторить спустя 3 - 4 недели. Случаи несоответствия должны быть исследованы специалистом-аллергологом иными *in vivo* методами, такими как провокационные тесты. Следует учесть, что эти тесты могут вызывать анафилактический шок.

Ложноположительные результаты теста могут быть получены при наличии перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вариабельность внутри одного исследования: средняя 6,2 %

Вариабельность между различными исследованиями: средняя 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro*-системы определения IgE. Результаты сравнивали с результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 2. Подобное сравнение было проведено и между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 2.

Результаты сравнения с количественной референтной системой:

Чувствительность: 84,3 %

Специфичность: 95,0 %

Точность: 90,6 %

Результаты сравнения с тестами кожной пробы:

Чувствительность: 95,1 %

Специфичность: 80,2 %

Точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции

К.И. Бланк



Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью _____ 4 _____ листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



Ж.И. Прищепа

11 ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель 3
(RIDA® AllergyScreen Panel 3)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)**

RIDA® AllergyScreen Panel 3

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений (пищевые аллергены)**1. НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор предназначен для *in vitro* диагностики. Он представляет собой тест для полуколичественного определения специфических IgE-антител к панели пищевых аллергенов в сыворотке крови человека методом иммуноблота.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса Е (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии. Когда имеется аллергическая реакция, аллергены, вызвавшие ее, могут быть установлены определением специфических IgE-антител в сыворотке крови. Данный метод может использоваться также для выявления сенсибилизации организма, не сопровождающейся видимыми симптомами.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 3 основан на принципе иммуноблотинга. Специфические пищевые аллергены, нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стрипов). Специфичные к этим аллергенам IgE-антитела, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP / NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® X-Screen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Membrane	Тестовые стрипы AllergyScreen: полоски нитроцеллюлозной мембраны, покрытые материалом аллергенов в виде 20 тест-полос на каждом стрипе; каждая полоска заключена в пластиковую кассету	10 стрипов
Wash	Промывочный буфер: 25х концентрат; Трис / NaCl; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 20 мл
Antibody	Проявляющие антитела: раствор биотинилированных поликлональных антител козы к IgE человека; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	1 x 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромнитродексана; готов к использованию	1 x 4 мл
Substrate	Субстрат: BCIP / NBT (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой)	1 x 4 мл
	Оценочный шаблон с цветовой шкалой	
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Тестовые стрипы необходимо хранить закрытыми в пластиковую упаковку в сухом, темном и прохладном месте. Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С, после вскрытия набора его можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер имеет срок годности 4 недели (температура хранения 2-8 °С). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1 Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2 Оборудование

- Вортекс
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 250 мкл
- Бутыль для промывочного буфера (на 500 мл)
- Держатель для 10 тестовых стрипов (необязательно) – устройство для удобства промывки и инкубации
- Инкубатор для проведения инкубации в условиях темноты (у фирмы R-Biopharm можно заказать полную систему, состоящую из держателя и инкубатора)
- Шейкер рокерного типа.
- Обычный фен для сушки волос, имеющийся в продаже (необязательно)
- Планшетный фотометр (RIDA® X-Screen), вместе с программным обеспечением и персональным компьютером с USB-портом (по дополнительному заказу)
- Планшетный фотометр (RIDA® maXi-Screen), вместе с программным обеспечением и экраном (по дополнительному заказу)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор теста RIDA® AllergyScreen Panel 3 используется только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Проявляющие антитела и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте

растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Конъюгат содержит метилизотиазолон и бромнитродексан в субтоксических концентрациях в качестве консерванта.

В случае повреждения наружной упаковки, перед тем как использовать компоненты набора, необходимо убедиться в их исправности. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена их индивидуальная упаковка или если кассеты со стрипами не были запечатаны.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 3 был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием все реагенты, сыворотки пациентов и кассеты с тестовыми стрипами необходимо прогреть до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор следует немедленно поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Тестовые стрипы нельзя использовать более одного раза. Реагенты и тестовые стрипы нельзя использовать, если упаковка нарушена или кассеты со стрипами не запечатаны.

Нельзя комбинировать компоненты из наборов разных серий или заменять какой-либо компонент на аналогичный из другой серии.

Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от соблюдения рекомендуемых времени и температуры инкубации, а также единообразия выполнения стадии промывки тестовых стрипов.

Не проводите тест в прямом солнечном свете. Кассету следует брать только за специальную ручку, не дотрагиваясь руками до реакционной поверхности стрипа. Рекомендуется данные о пациенте (такие как номер, присвоенный в лаборатории) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Приготовьте рабочее разведение промывочного буфера из одного флакона концентрата **Wash**, доведя объем дистиллированной водой в мерном цилиндре до 500 мл, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в лабораторную бутылку для промывочного буфера. Если в концентрате **Wash** присутствуют кристаллы солей, растворите их, предварительно прогрев концентрат на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое для проведения анализа количество стрипов **Membrane** и промойте их по отдельности в течение 5 секунд под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером. Данный процесс можно упростить, используя специальное приспособление-держатель **Membrane**, в которое можно вставить до 10 стрипов. Добейтесь, чтобы промывочный буфер полностью смачивал стрипы. Проще всего это сделать, поместив держатель в горизонтальное положение и, после заполнения стрипов буфером, покачать несколько раз держатель вперед-назад. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane**, снова быстро промойте достаточным количеством разведенного промывочного буфера и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала (бумажного полотенца или фильтровальной бумаги). Затем внесите в каждый стрип **Membrane** по 250 мкл исследуемой сыворотки пациента и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.4. Промывка

Промывайте тестовые стрипы **Membrane** под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. Держите стрипы **Membrane** вертикально, верхним концом вниз, чтобы избежать попадания сыворотки на соседние тестовые стрипы. Промывайте каждый тестовый стрип несколько раз, каждый раз вытряхивая буфер. Затем заполните стрипы **Membrane** разведенным промывочным буфером и покачайте несколько раз вперед-назад. Затем, придерживая перевернутые тестовые стрипы **Membrane** наклонно, ополаскивайте их из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane** и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) проявляющих антител **Antibody**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.6. Промывка

См. раздел 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 20 минут.

9.8. Промывка

См. раздел 9.4.

9.9. Четвертая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) только на шейкере рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в темноте в течение 20 минут.

По окончании инкубации остановите развитие цветной реакции интенсивным промыванием стрипов **Membrane** проточной водопроводной водой. Затем стрипы высушите на воздухе или используйте для ускорения процесса сушки обычный фен для волос. В результате высушивания сине-сиреневое окрашивание фона исчезает. Поэтому оценку результатов на тестовых стрипах **Membrane** нельзя проводить до полного высушивания.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА ИСТЕЧЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Тест выполнен правильно, если фон отсутствует, а положительный контроль дает хорошо окрашенную полосу.

Если ожидаемые значения не укладываются в полученные результаты или если реагент мутный или если раствор субстрата приобрел синюю окраску до того, как его добавили к тестовым стрипам, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек.

Если вы не получили предусмотренные результаты, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка)
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в панели 3 набора RIDA® AllergyScreen Panel 3:

	Положительный контроль
	Лесной орех
	Арахис
	Грецкий орех
	Миндальный орех
	Молоко
	Яичный белок
	Яичный желток
	Казеин
	Картофель
	Сельдерей
	Морковь
	Томаты
	Треска
	Краб
	Апельсин
	Яблоко
	Пшеничная мука
	Ржаная мука
	Кунжутное семя
	Соевые бобы

Информация о конфигурации стрипов имеется в виде приложений на домашней странице компании R-Biopharm AG.

В качестве положительного контроля в конце каждого стрипа нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

11.2.1. Визуальная оценка

Интенсивность окрашивания полос на тестовом стрипе прямо пропорциональна количеству соответствующих специфических IgE к аллергенам в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в насыщенности цветом фона мембраны и полосы в месте расположения соответствующего аллергена. Если разницы с фоном нет, значит данный тест RIDA® AllergyScreen Panel 3 не подтверждает наличия специфических IgE-антител к этому аллергену.

Полуколичественную оценку можно проводить визуально по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения предлагается использование цветной шкалы (в левой части прилагаемого оценочного шаблона).

Классы аллергореактивности, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно соотнести с содержанием соответствующих IgE, используя таблицу 3.

Таблица 3. Соотношение между определяемыми классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом
1	Низкое
2	Увеличенное
3	Существенно увеличенное
4	Высокое

11.2.2. Количественная оценка с использованием прибора RIDA® X Screen

Для количественной оценки тестовые стрипы вставляют в держатель и считывают результат на приборе RIDA® X-Screen, используя соответствующее программное обеспечение. По измеренным значениям автоматически рассчитывается концентрация аллерген-специфических IgE в каждой полосе в МЕ/мл и назначаются классы аллергореактивности от 0 до 6. Оценка производится автоматически по стандартной кривой, хранящейся в программе оценки.

Начиная измерение, внимательно следите за тем, чтобы использовать нужный предустановленный тест (зависит от панели аллергенов).

Используя таблицу 4, по концентрации или классу, соответствующему этой концентрации, можно определить титр аллерген-специфических IgE.

Таблица 4. Соотношение между концентрациями в МЕ/мл, классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	Отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	Низкое
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	Увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	Существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	Высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	Очень высокое
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	Чрезвычайно высокое

11.3. Контроль качества результатов

Положительный контроль включен в каждый тестовый стрип. Он используется для проверки правильности проведения теста.

Подсчет с использованием прибора RIDA® X Screen

Если значение класса для положительного контроля < 2,5, тест считается проведенным неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Если полоса положительного контроля не окрашена, тест считается проведенным неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка) – проверяется только при полуколичественной оценке
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11.4. Документирование результатов

После того, как тестовые стрипы высушены и исследованы на приборе RIDA® X-Screen или визуально, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

Данные измерения (фотография стрипа и ее оценка) заносятся на твердый диск персонального компьютера в заранее выбранную директорию. Распечатка данных по каждой исследованной сыворотке может быть сделана с любого стандартного принтера, соединенного с персональным компьютером.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgE, измеренные с использованием данной тест-системы, дают возможность получить лишь некоторое представление о степени сенсилизации пациента к индивидуальным аллергенам или смеси тестируемых аллергенов.

Они не могут быть использованы для выведения соотношения определяемой концентрации IgE и наличия серьезных клинических симптомов. Полученные результаты всегда следует интерпретировать с учетом полной клинической картины заболевания.

В связи с отсутствием национальных и международных стандартов и возможными различиями в растворах тестов кожной пробы и экстрактов аллергенов, используемых в тестах *in vitro*, возможны несоответствия результатов тестов *in vivo* и *in vitro*. Титры IgE, измеренные непосредственно после появления анафилактических реакций, могут быть отрицательными или слишком низкими. В случае такого несоответствия результатов диагностики *in vitro* и *in vivo* тест следует повторить спустя 3 - 4 недели. Случаи несоответствия должны быть исследованы специалистом-аллергологом иными *in vivo* методами, такими как провокационные тесты. Следует учесть, что эти тесты могут вызывать анафилактический шок.

Ложноположительные результаты теста могут быть получены при наличии перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вариабельность внутри одного исследования: средняя 6,2 %

Вариабельность между различными исследованиями: средняя 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro*-системы определения IgE. Результаты сравнивали с результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 3. Подобное сравнение было проведено и между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen.

Результаты сравнения с количественной референтной системой:

Чувствительность: 84,3 %

Специфичность: 95,0 %

Точность: 90,6 %

Результаты сравнения с тестами кожной пробы:

Чувствительность: 95,1 %

Специфичность: 80,2 %

Точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «АНАЛИТИКА»
М.И. Прищепа
«17» ноября 2009 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител, панель 4
(RIDA® AllergyScreen Panel 4)
производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® AllergyScreen Panel 4

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений (педиатрическая панель)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для *in vitro* диагностики. Он представляет собой тест для полуколичественного определения специфических IgE-антител к панели индивидуальных аллергенов в сыворотке крови человека методом иммуноблота.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии. Когда имеется аллергическая реакция, аллергены, вызвавшие ее, могут быть установлены определением специфических IgE-антител в сыворотке крови. Данный метод может использоваться также для выявления сенсибилизации организма, не сопровождающейся видимыми симптомами.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 4 основан на принципе иммуноблотинга. Специфические аллергены, нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стрипов). Специфичные к этим аллергенам IgE-антитела, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP / NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® X-Screen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Membrane	Тестовые стрипы AllergyScreen: полоски нитроцеллюлозной мембраны, покрытые материалом аллергенов в виде 20 тест-полос на каждом стрипе; каждая полоска заключена в пластиковую кассету	10 стрипов
Wash	Промывочный буфер: 25х концентрат; Трис / NaCl; содержит 0,1% NaN ₃	1 x 20 мл
Antibody	Проявляющие антитела: раствор биотинилированных поликлональных антител козы к IgE человека; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	1 x 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромнитродексана; готов к использованию	1 x 4 мл
Substrate	Субстрат: BCIP / NBT (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой)	1 x 4 мл
	Оценочный шаблон с цветовой шкалой	
	Инструкция по применению	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Тестовые стрипы необходимо хранить закрытыми в пластиковую упаковку в сухом, темном и прохладном месте. Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С, после вскрытия набора его можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер имеет срок годности 4 недели (температура хранения 2-8 °С). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1 Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода

6.2 Оборудование

- Вортекс
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 250 мкл
- Бутыль для промывочного буфера (на 500 мл)
- Держатель для 10 тестовых стрипов (необязательно) – устройство для удобства промывки и инкубации
- Инкубатор для проведения инкубации в условиях темноты (у фирмы R-Biopharm можно заказать полную систему, состоящую из держателя и инкубатора)
- Шейкер рокерного типа.
- Обычный фен для сушки волос, имеющийся в продаже (необязательно)
- Планшетный фотометр (RIDA® X-Screen), вместе с программным обеспечением и персональным компьютером с USB-портом (по дополнительному заказу)
- Планшетный фотометр (RIDA® maXi-Screen), вместе с программным обеспечением и экраном (по дополнительному заказу)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор теста RIDA® AllergyScreen Panel 4 используется только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Проявляющие антитела и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте

растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Конъюгат содержит метилизотиазолон и бромнитродексан в субтоксических концентрациях в качестве консерванта.

В случае повреждения наружной упаковки, перед тем как использовать компоненты набора, необходимо убедиться в их исправности. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена их индивидуальная упаковка или если кассеты со стрипами не были запечатаны.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавировать при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест RIDA® AllergyScreen Panel 4 был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием все реагенты, сыворотки пациентов и кассеты с тестовыми стрипами необходимо прогреть до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор следует немедленно поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Тестовые стрипы нельзя использовать более одного раза. Реагенты и тестовые стрипы нельзя использовать, если упаковка нарушена или кассеты со стрипами не запечатаны.

Нельзя комбинировать компоненты из наборов разных серий или заменять какой-либо компонент на аналогичный из другой серии.

Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от соблюдения рекомендуемых времени и температуры инкубации, а также единообразия выполнения стадии промывки тестовых стрипов.

Не проводите тест в прямом солнечном свете. Кассету следует брать только за специальную ручку, не затрагивая руками до реакционной поверхности стрипа. Рекомендуется данные о пациенте (такие как номер, присвоенный в лаборатории) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Приготовьте рабочее разведение промывочного буфера из одного флакона концентрата **Wash**, доведя объем дистиллированной водой в мерном цилиндре до 500 мл, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в лабораторную бутылку для промывочного буфера. Если в концентрате **Wash** присутствуют кристаллы солей, растворите их, предварительно прогрев концентрат на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое для проведения анализа количество стрипов **Membrane** и промойте их по отдельности в течение 5 секунд под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером. Данный процесс можно упростить, используя специальное приспособление-держатель **Membrane**, в которое можно вставить до 10 стрипов. Добейтесь, чтобы промывочный буфер полностью смачивал стрипы. Проще всего это сделать, поместив держатель в горизонтальное положение и, после заполнения стрипов буфером, покачать несколько раз держатель вперед-назад. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane**, снова быстро промойте достаточным количеством разведенного промывочного буфера и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала (бумажного полотенца или фильтровальной бумаги). Затем внесите в каждый стрип **Membrane** по 250 мкл исследуемой сыворотки пациента и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.4. Промывка

Промывайте тестовые стрипы **Membrane** под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. Держите стрипы **Membrane** вертикально, верхним концом вниз, чтобы избежать попадания сыворотки на соседние тестовые стрипы. Промывайте каждый тестовый стрип несколько раз, каждый раз вытряхивая буфер. Затем заполните стрипы **Membrane** разведенным промывочным буфером и покачайте несколько раз вперед-назад. Затем, придерживая перевернутые тестовые стрипы **Membrane** наклонно, ополаскивайте их из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane** и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) проявляющих антител **Antibody**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.6. Промывка

См. раздел 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 20 минут.

9.8. Промывка

См. раздел 9.4.

9.9. Четвертая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) только на шейкере рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в темноте в течение 20 минут.

По окончании инкубации остановите развитие цветной реакции интенсивным промыванием стрипов **Membrane** проточной водопроводной водой. Затем стрипы высушите на воздухе или используйте для ускорения процесса сушки обычный фен для волос. В результате высушивания сине-сиреневое окрашивание фона исчезает. Поэтому оценку результатов на тестовых стрипах **Membrane** нельзя проводить до полного высушивания.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА ИСТЕЧЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Тест выполнен правильно, если фон отсутствует, а положительный контроль дает хорошо окрашенную полосу.

Если ожидаемые значения не укладываются в полученные результаты или если реагент мутный или если раствор субстрата приобрел синюю окраску до того, как его добавили к тестовым стрипам, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек.

Если вы не получили предусмотренные результаты, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка)
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. Конфигурация стрипов в панели 4 набора RIDA® AllergyScreen Panel 4:

	Положительный контроль
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. pteronyssinus</i>
	Домашняя пыль клещ <i>Derm. farinae</i>
	Береза
	Смесь трав
	Кошка
	Собака
	<i>Alternaria alternata</i>
	Молоко
	α -лактальбумин
	β -лактоглобулин
	Казеин
	Яичный белок
	Яичный желток
	Бычий сывороточный альбумин
	Соевые бобы
	Морковь
	Картофель
	Пшеничная мука
	Лесной орех
	Арахис

Информация о конфигурации стрипов имеется в виде приложений на домашней странице компании R-Biopharm AG.

В качестве положительного контроля в конце каждого стрипа нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

11.2.1. Визуальная оценка

Интенсивность окрашивания полос на тестовом стрипе прямо пропорциональна количеству соответствующих специфических IgE к аллергенам в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в насыщенности цветом фона мембраны и полосы в месте расположения соответствующего

аллергена. Если разницы с фоном нет, значит данный тест RIDA® AllergyScreen Panel 4 не подтверждает наличия специфических IgE-антител к этому аллергену.

Полуколичественную оценку можно проводить визуально по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения предлагается использование цветной шкалы (в левой части прилагаемого оценочного шаблона).

Классы аллергореактивности, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно соотнести с содержанием соответствующих IgE, используя таблицу 3.

Таблица 3. Соотношение между определяемыми классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом
1	Низкое
2	Увеличенное
3	Существенно увеличенное
4	Высокое

11.2.2. Количественная оценка с использованием прибора RIDA® X Screen

Для количественной оценки тестовые стрипы вставляют в держатель и считывают результат на приборе RIDA® X-Screen, используя соответствующее программное обеспечение. По измеренным значениям автоматически рассчитывается концентрация аллерген-специфических IgE в каждой полосе в МЕ/мл и назначаются классы аллергореактивности от 0 до 6. Оценка производится автоматически по стандартной кривой, хранящейся в программе оценки.

Начиная измерение, внимательно следите за тем, чтобы использовать нужный предустановленный тест (зависит от панели аллергенов).

Используя таблицу 4, по концентрации или классу, соответствующему этой концентрации, можно определить титр аллерген-специфических IgE.

Таблица 4. Соотношение между концентрациями в МЕ/мл, классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	Отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	Низкое
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	Увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	Существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	Высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	Очень высокое
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	Чрезвычайно высокое

11.3. Контроль качества результатов

Положительный контроль включен в каждый тестовый стрип. Он используется для проверки правильности проведения теста.

Подсчет с использованием прибора RIDA® X Screen

Если значение класса для положительного контроля < 2,5, тест считается проведенным неправильно.

Оптико-визуальная оценка

Если полоса положительного контроля не окрашена, тест считается проведенным неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка) – проверяется только при полуколичественной оценке
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11.4. Документирование результатов

После того, как тестовые стрипы высушены и исследованы на приборе RIDA® X-Screen или визуально, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал.

Данные измерения (фотография стрипа и ее оценка) заносятся на твердый диск персонального компьютера в заранее выбранную директорию. Распечатка данных по каждой исследованной сыворотке может быть сделана с любого стандартного принтера, соединенного с персональным компьютером.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgE, измеренные с использованием данной тест-системы, дают возможность получить лишь некоторое представление о степени сенсибилизации пациента к индивидуальным аллергенам или смеси тестируемых аллергенов.

Они не могут быть использованы для выведения соотношения определяемой концентрации IgE и наличия серьезных клинических симптомов. Полученные результаты всегда следует интерпретировать с учетом полной клинической картины заболевания.

В связи с отсутствием национальных и международных стандартов и возможными различиями в растворах тестов кожной пробы и экстрактов аллергенов, используемых в тестах *in vitro*, возможны несоответствия результатов тестов *in vivo* и *in vitro*. Титры IgE, измеренные непосредственно после появления анафилактических реакций, могут быть отрицательными или слишком низкими. В случае такого несоответствия результатов диагностики *in vitro* и *in vivo* тест следует повторить спустя 3 - 4 недели. Случаи несоответствия должны быть исследованы специалистом-аллергологом иными *in vivo* методами, такими как провокационные тесты. Следует учесть, что эти тесты могут вызывать анафилактический шок.

Ложноположительные результаты теста могут быть получены при наличии перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вариабельность внутри одного исследования: средняя 6,2 %

Вариабельность между различными исследованиями: средняя 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro*-системы определения IgE. Результаты сравнивали с результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 4. Подобное сравнение было проведено и между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 4.

Результаты сравнения с количественной референтной системой:

Чувствительность: 84,3 %

Специфичность: 95,0 %

Точность: 90,6 %

Результаты сравнения с тестами кожной пробы:

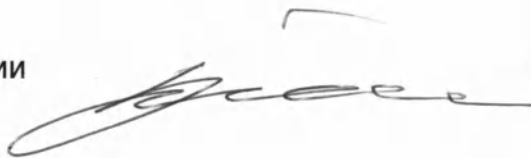
Чувствительность: 95,1 %

Специфичность: 80,2 %

Точность: 88,3 %

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 4 листов.



УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ЗАО «АНАЛИТИКА»



М.И. Прищепа

12 ноября 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для определения специфических IgE антител

(RIDA® AllergyScreen Reagent Kit)

производства фирмы R-Biopharm AG (Германия)

RIDA® AllergyScreen Reagent Kit

Иммуноблот для проведения анализа специфических IgE в сыворотке крови человека

Набор рассчитан на 10 определений

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для *in vitro* диагностики. Он представляет собой тест для полуколичественного определения специфических IgE-антител к панели индивидуальных аллергенов в сыворотке крови человека методом иммуноблота.

2. ВВЕДЕНИЕ

Назначение иммунной системы состоит в защите организма от патогенных бактерий, вирусов и других микроорганизмов. Защитная реакция необходима для обеспечения обороны организма при начальном контакте с патогенами, а также для его иммунизации при повторном контакте. Всем аллергическим реакциям предшествует бессимптомная фаза первоначального контакта, во время которой образуются специфические иммуноглобулины класса E (IgE-антитела). При повторном контакте с аллергенами, запускающими реакцию, эти IgE-антитела реагируют с аллергенами и приводят к высвобождению медиаторов (из тучных клеток или мастоцитов), таких как гистамин, лейкотриены, простагландины и т.д., которые приводят к развитию симптомов аллергии. Когда имеется аллергическая реакция, аллергены, вызвавшие ее, могут быть установлены определением специфических IgE-антител в сыворотке крови. Данный метод может использоваться также для выявления сенсилизации организма, не сопровождающейся видимыми симптомами.

3. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест RIDA® AllergyScreen Reagent Kit основан на принципе иммуноблотинга. Специфические аллергены нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стрипов). Специфические к этим аллергенам IgE-антитела, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP/NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® X-Screen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

4. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ, ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Таблица 1. Состав набора (содержит все реагенты, необходимые для выполнения 96 определений).

Wash	Промывочный буфер: 25x концентрат; Трис / NaCl; содержит 0,1% NaN ₃	2 x 20 мл
Antibody	Проявляющие антитела: раствор биотинилированных поликлональных антител козы к IgE человека; содержит 0,1% NaN ₃ ; готов к использованию	2 x 4 мл
Conjugate	Конъюгат стрептавидина: стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой; содержит 0,02% метилизотиазолона, 0,02% бромнитродексана; готов к использованию	2 x 4 мл
Substrate	Субстратный раствор: BCIP / NBT (бромхлориндолил фосфат / нитротетразолий голубой)	2 x 4 мл
	Оценочный шаблон с цветовой шкалой	

5. ХРАНЕНИЕ НАБОРА

Все реагенты необходимо хранить при 2-8 °С, после вскрытия набора его можно использовать до окончания срока годности, указанного на этикетке. Разведенный промывочный буфер имеет срок годности 4 недели (температура хранения 2-8 °С). Микробная контаминация должна быть исключена. Качество невозможно гарантировать, если срок годности набора истек.

Контаминация субстратного раствора конъюгатом должна быть исключена, так как она приводит к окрашиванию субстрата. По этой же причине субстрат следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей, чтобы не допустить его порчи или окрашивания из-за самоокисления. Если субстрат приобрел окраску, он становится непригодным для использования.

6. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

6.1. Реагенты

Дистиллированная или деионизованная вода.

6.2. Оборудование

- Вортекс
- Мерный цилиндр на 500 мл
- Микропипетки, позволяющие отбирать объем 250 мкл
- Бутыль для промывочного буфера объемом 500 мл
- Держатель для 10 тестовых стрипов (необязательно) – устройство для удобства промывки и инкубации
- Инкубатор для проведения инкубации в условиях темноты (у фирмы R-Biopharm можно заказать полную систему, состоящую из держателя и инкубатора)
- Шейкер рокерного типа.
- Обычный фен для сушки волос, имеющийся в продаже (необязательно)
- Планшетный фотометр (RIDA® X-Screen), вместе с программным обеспечением и персональным компьютером с USB-портом (по дополнительному заказу)
- Планшетный фотометр (RIDA® maXi-Screen), вместе с программным обеспечением и экраном (по дополнительному заказу)

7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

Набор теста RIDA® AllergyScreen Reagent Kit используется только в диагностических целях *in vitro*.

Этот тест должен выполняться только квалифицированным персоналом. При выполнении теста следует руководствоваться правилами работы в медицинских лабораториях и точно соблюдать инструкцию.

Не пипетируйте ртом. Не допускайте контакта реагентов с поврежденными участками кожи и слизистыми. При работе с образцами пользуйтесь одноразовыми перчатками, а после окончания работы тщательно вымойте руки. Не курите, не ешьте и не пейте в помещении, где проводят работу с образцами или реагентами набора.

Проявляющие антитела и концентрат промывочного буфера содержат азид натрия в качестве консерванта. Необходимо исключить контакт этого вещества с кожей и слизистыми. Учитывайте, что при контакте растворов, содержащих азид натрия, со свинцовыми и медными трубами могут возникать взрывоопасные азиды металлов.

Конъюгат содержит метилизотиазолон и бромнитродексан в субтоксических концентрациях в качестве консерванта.

В случае повреждения наружной упаковки, перед тем как использовать компоненты набора, необходимо убедиться в их исправности. Нельзя использовать отдельные компоненты набора, если была повреждена их индивидуальная упаковка или если кассеты со стрипами не были запечатаны.

После использования набора пользователь несет персональную ответственность за надлежащую утилизацию всех компонентов набора.

Все реагенты и материалы, имевшие контакт с потенциально инфицированными образцами, необходимо обработать обеззараживающими веществами или проавтоклавить при 121 °C не менее 1 часа.

8. СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Тест RIDA® AllergyScreen Reagent Kit был разработан для анализа образцов сыворотки крови человека. После взятия крови сыворотку следует как можно быстрее отделить от сгустка для предотвращения гемолиза. Образцы до тестирования следует хранить охлажденными или в замороженном виде.

Ни в коем случае нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов, а также микробной контаминации. Использование образцов, инактивированных прогреванием, или с признаками гемолиза, а также липемических, иктерических, мутных – может привести к получению ошибочных результатов.

Таблица 2. Хранение образцов.

Неразведенная сыворотка		Разведенная сыворотка
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 неделя	> 1 недели	7 часов

9. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

9.1. Общие замечания

Перед использованием все реагенты, сыворотки пациентов и кассеты с тестовыми стрипами необходимо прогреть до комнатной температуры. Тщательно перемешайте реагенты перед использованием. После использования набор следует немедленно поместить на хранение при температуре 2-8 °C.

Тестовые стрипы нельзя использовать более одного раза. Реагенты и тестовые стрипы нельзя использовать, если упаковка нарушена или кассеты со стрипами не запечатаны.

Нельзя комбинировать компоненты из наборов разных серий или заменять какой-либо компонент на аналогичный из другой серии.

Воспроизводимость результатов анализа существенно зависит от соблюдения рекомендуемых времени и температуры инкубации, а также единообразия выполнения стадии промывки тестовых стрипов.

Не проводите тест в прямом солнечном свете. Кассету следует брать только за специальную ручку, не дотрагиваясь руками до реакционной поверхности стрипа. Рекомендуется данные о пациенте (такие как номер, присвоенный в лаборатории) наносить на ручку кассеты несмываемым маркером с мягким стержнем.

9.2. Приготовление промывочного буфера

Приготовьте рабочее разведение промывочного буфера из одного флакона концентрата **Wash**, доведя объем дистиллированной водой в мерном цилиндре до 500 мл, перемешайте и перелейте приготовленный раствор в лабораторную бутылку для промывочного буфера. Если в концентрате **Wash** присутствуют кристаллы солей, растворите их, предварительно прогрев концентрат на водяной бане при 37 °C.

9.3. Первая инкубация

Выньте из упаковки необходимое для проведения анализа количество стрипов **Membrane** и промойте их по отдельности в течение 5 секунд под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером. Данный процесс можно упростить, используя специальное приспособление-держатель **Membrane**, в которое можно вставить до 10 стрипов. Добейтесь, чтобы промывочный буфер полностью смачивал стрипы. Проще всего это сделать, поместив держатель в горизонтальное положение и, после заполнения стрипов буфером, покачать несколько раз держатель вперед-назад. После этого полностью вытряхните жидкость из стрипов **Membrane**, снова быстро промойте достаточным количеством разведенного промывочного буфера и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала (бумажного полотенца или фильтровальной бумаги). Затем внесите в каждый стрип **Membrane** по 250 мкл исследуемой сыворотки пациента и инкубируйте при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.4. Промывка

Промывайте тестовые стрипы **Membrane** под струей из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. Держите стрипы **Membrane** вертикально, верхним концом вниз, чтобы избежать попадания сыворотки на соседние тестовые стрипы. Промывайте каждый тестовый стрип несколько раз, каждый раз вытряхивая буфер. Затем заполните стрипы **Membrane** разведенным промывочным буфером и покачайте несколько раз вперед-назад. Затем, придерживая перевернутые тестовые стрипы **Membrane** наклонно,

ополаскивайте их из бутылки с разведенным промывочным буфером в течение 5 секунд. После этого полностью встряхните жидкость из стрипов **Membrane** и удалите остатки жидкости, постукивая стрипами **Membrane** по листу из влагопоглощающего материала.

9.5. Вторая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) проявляющих антител **Antibody**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 45 минут.

9.6. Промывка

См. раздел 9.4.

9.7. Третья инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) конъюгата **Conjugate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) на шейкере только рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в течение 20 минут.

9.8. Промывка

См. раздел 9.4.

9.9. Четвертая инкубация

Добавьте в каждый тестовый стрип **Membrane** по 5 капель (около 250 мкл) субстрата **Substrate**. Инкубируйте стрипы **Membrane** при комнатной температуре (20-25 °C) только на шейкере рокерного типа со скоростью 30-120 качаний в минуту в темноте в течение 20 минут.

По окончании инкубации остановите развитие цветной реакции интенсивным промыванием стрипов **Membrane** проточной водопроводной водой. Затем стрипы высушите на воздухе или используйте для ускорения процесса сушки обычный фен для волос. В результате высушивания сине-сиреневое окрашивание фона исчезает. Поэтому оценку результатов на тестовых стрипах **Membrane** нельзя проводить до полного высушивания.

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА – УКАЗАНИЯ НА ИСТЕЧЕНИЕ СРОКА ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Тест выполнен правильно, если фон отсутствует, а положительный контроль дает хорошо окрашенную полосу.

Если ожидаемые значения не укладываются в полученные результаты или если реагент мутный или если раствор субстрата приобрел синюю окраску до того, как его добавили к тестовым стрипам, это может быть указанием на то, что срок годности реагентов набора истек.

Если вы не получили предусмотренные результаты, перед тем, как повторить тестирование, проверьте следующие позиции:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка)
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Информация о конфигурации стрипов имеется в виде приложений на домашней странице компании R-Biopharm AG.

В качестве положительного контроля в конце каждого стрипа нанесен биотинилированный бычий сывороточный альбумин.

11.2. Анализ результатов, полученных с сыворотками

11.2.1. Визуальная оценка

Интенсивность окрашивания полос на тестовом стрипе прямо пропорциональна количеству соответствующих специфических IgE к аллергенам в сыворотке пациента.

На присутствие в исследуемой сыворотке аллерген-специфических антител указывает видимая глазом разница в насыщенности цветом фона мембраны и полосы в месте расположения соответствующего аллергена. Если разницы с фоном нет, значит тест не подтверждает наличия специфических IgE-антител к этому аллергену.

Полуколичественную оценку можно проводить визуально по серой шкале, разделенной на 4 класса. Для прямого сравнения предлагается использование цветной шкалы (в левой части прилагаемого оценочного шаблона).

Классы аллергореактивности, определенные для каждого аллергена по той или другой шкале, можно соотнести с содержанием соответствующих IgE, используя таблицу 3.

Таблица 3. Соотношение между определяемыми классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0	Отсутствует или обнаруживается с трудом
1	Низкое
2	Увеличенное
3	Существенно увеличенное
4	Высокое

11.2.2. Количественная оценка с использованием прибора RIDA® X Screen

Для количественной оценки тестовые стрипы вставляют в держатель и считывают результат на приборе RIDA® X-Screen, используя соответствующее программное обеспечение. По измеренным значениям автоматически рассчитывается концентрация аллерген-специфических IgE в каждой полосе в МЕ/мл и назначаются классы аллергореактивности от 0 до 6. Оценка производится автоматически по стандартной кривой, хранящейся в программе оценки.

Начиная измерение, внимательно следите за тем, чтобы использовать нужный предустановленный тест (зависит от панели аллергенов).

Используя таблицу 4, по концентрации или классу, соответствующему этой концентрации, можно определить титр аллерген-специфических IgE.

Таблица 4. Соотношение между концентрациями в МЕ/мл, классами и содержанием в сыворотке пациента соответствующих аллерген-специфических IgE.

МЕ/мл	Класс	Содержание аллерген-специфических IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	Отсутствует или обнаруживается с трудом
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	Низкое
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	Увеличенное
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	Существенно увеличенное
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	Высокое
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	Очень высокое
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	Чрезвычайно высокое

11.3. Контроль качества результатов

Положительный контроль включен в каждый тестовый стрип. Он используется для проверки правильности проведения теста.

Подсчет с использованием прибора RIDA® X Screen

Если значение класса для положительного контроля < 2,5, тест считается проведенным неправильно.

Опико-визуальная оценка

Если полоса положительного контроля не окрашена, тест считается проведенным неправильно.

В этом случае, а также при очень слабом окрашивании полосы положительного контроля, пожалуйста, проверьте следующие моменты, прежде чем повторять анализ:

- Срок годности используемых реагентов
- Функциональность используемого оборудования (например, его калибровка) – проверяется только при полуколичественной оценке
- Точность исполнения анализа
- Визуально проверьте компоненты набора для выявления признаков контаминации или утечки – раствор субстрата нельзя использовать, если он имеет синее окрашивание.

Если результаты, полученные для контролей, отличаются от ожидаемых даже после повторного тестирования, свяжитесь со своим поставщиком.

11.4. Документирование результатов

После того, как тестовые стрипы высушены и исследованы на приборе RIDA® X-Screen или визуально, их можно извлечь пинцетом из реакционной кассеты и поместить в лабораторный журнал. Данные измерения (фотография стрипа и ее оценка) заносятся на твердый диск персонального компьютера в заранее выбранную директорию. Распечатка данных по каждой исследованной сыворотке может быть сделана с любого стандартного принтера, соединенного с персональным компьютером.

12. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Концентрации IgE, измеренные с использованием данной тест-системы, дают возможность получить лишь некоторое представление о степени сенсилизации пациента к индивидуальным аллергенам или смеси тестируемых аллергенов.

Они не могут быть использованы для выведения соотношения определяемой концентрации IgE и наличия серьезных клинических симптомов. Полученные результаты всегда следует интерпретировать с учетом полной клинической картины заболевания.

В связи с отсутствием национальных и международных стандартов и возможными различиями в растворах тестов кожной пробы и экстрактов аллергенов, используемых в тестах *in vitro*, возможны несоответствия результатов тестов *in vivo* и *in vitro*. Титры IgE, измеренные непосредственно после появления анафилактических реакций, могут быть отрицательными или слишком низкими. В случае такого несоответствия результатов диагностики *in vitro* и *in vivo* тест следует повторить спустя 3 - 4 недели. Случаи несоответствия должны быть исследованы специалистом-аллергологом иными *in vivo* методами, такими как провокационные тесты. Следует учесть, что эти тесты могут вызывать анафилактический шок.

Ложноположительные результаты теста могут быть получены при наличии перекрестной реактивности тестируемых антигенов с другими антигенами.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вариабельность внутри одного исследования: средняя 6,2 %

Вариабельность между различными исследованиями: средняя 3,1 %

Для определения чувствительности и специфичности метода, в рамках клинических испытаний, было исследовано 110 сывороток (всего 520 определений) с помощью количественной референтной *in vitro*-системы определения IgE. Результаты сравнивали с результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Reagent Kit. Подобное сравнение было проведено и между результатами 225 тестов кожной пробы и результатами тестирования набором RIDA® AllergyScreen Panel 4.

Результаты сравнения с количественной референтной системой:

Чувствительность:	84,3 %
Специфичность:	95,0 %
Точность:	90,6 %

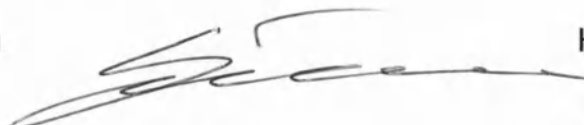
Результаты сравнения с тестами кожной пробы:

Чувствительность:	95,1 %
Специфичность:	80,2 %
Точность:	88,3 %

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 3 3 листов.

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала инструкции.

Начальник отдела продукции



К.И. Бланк

