

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО "Компания Алкор Био"



Д.Г. Польшцев

« 10 » 04 20 20 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
Медицинского изделия для диагностики *in vitro*
Набора реагентов с принадлежностями для
количественного иммуноферментного определения
общего иммуноглобулина Е
в сыворотке крови человека
«ИФА-общий IgE 2000»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор «ИФА-общий IgE 2000» предназначен для количественного иммуноферментного определения общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови человека.

1.2. IgE — класс иммуноглобулинов, содержание которых в сыворотке крови в норме крайне мало. Концентрация IgE в сыворотке крови возрастает постепенно с момента рождения человека до подросткового возраста. У взрослых людей концентрация IgE в норме может достигать 100 МЕ/мл. В пожилом возрасте уровень IgE иногда снижается.

Продукция IgE имеет существенное значение в антигельминтном иммунитете. При аскаридозе обнаруживается 15-20- кратное повышение концентрации IgE.

В развитых странах выявление повышенных концентраций IgE чаще связано с развитием аллергических заболеваний. Определение общего IgE имеет важное

прогностическое значение. Его уровень выше 95 % верхнего возрастного предела нормы выявляют у 75 % детей, родители которых имеют аллергические заболевания. Выявление высоких концентраций общего IgE в сыворотке крови является важным вспомогательным средством, позволяющим выявлять аллергические заболевания среди множества патологий, клинически проявляющихся как астма, частые заболевания дыхательных путей, хронические синуситы и дерматиты. Повышенные концентрации IgE в сыворотке крови отмечают также при гипер-IgE синдроме, лимфосаркоме.

1.3. Функциональное назначение набора «ИФА-общий IgE 2000» — вспомогательное средство в диагностике аллергических и других заболеваний, ведущих к изменению уровня общего IgE в сыворотке крови человека.

1.4. Набор «ИФА-общий IgE 2000» предназначен для однократного применения.

1.5. Набор «ИФА-общий IgE 2000» предназначен для лабораторной диагностики *in vitro*.

1.6. Набор «ИФА-общий IgE 2000» предназначен для обследования всех групп населения без градации по демографическому или популяционному признаку.

1.7. Противопоказания к применению набора «ИФА-общий IgE 2000» отсутствуют.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

В наборе «ИФА-общий IgE 2000» использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной

специфичностью к IgE. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе — конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител к IgE, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация IgE, содержащегося в исследуемом образце, и связывание образовавшегося комплекса с конъюгатом.

Несвязавшиеся компоненты удаляются промывкой. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству IgE в исследуемом образце (Рисунок 1).

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации IgE в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация IgE в исследуемых образцах.

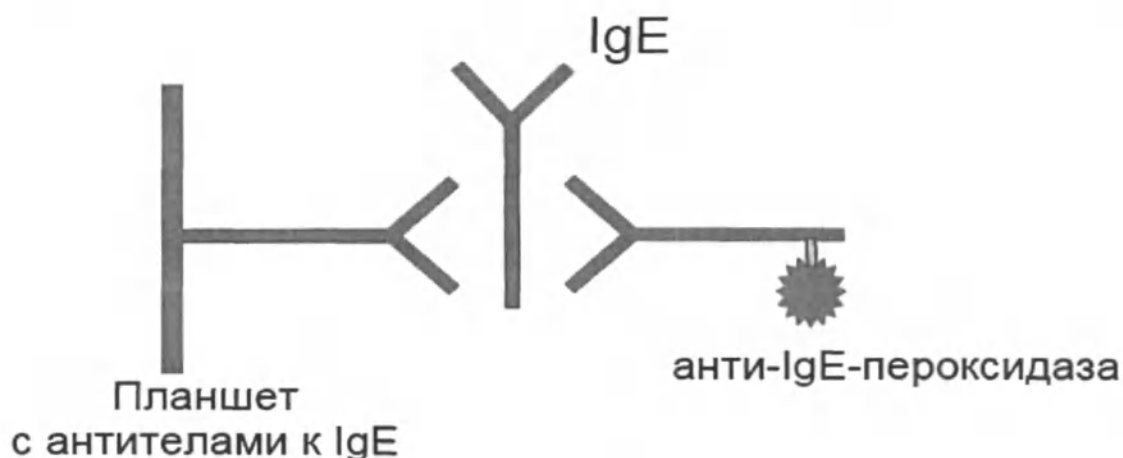


Рисунок 1. Схема анализа

2.2. Состав набора

Набор «ИФА-общий IgE 2000» выпускается в двух комплектациях¹:

Комплектация №1: на 96 определений при проведении анализа вручную в дубликатах 40 неизвестных проб при использовании 6 калибровочных проб или в дубликатах 39 неизвестных проб при использовании 7 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация №2: на 96 определений при проведении анализа на автоматическом анализаторе «Alisei Q.S.» SEAC/Next Level, Италия (далее «Alisei») в монопликатах 78 неизвестных проб, в дубликатах 7 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

Обратите внимание, при каждой постановке анализа обязательно нужно определять оптические плотности (ОП) калибровочных проб и ОП раствора ТМБ, а также концентрацию контрольной сыворотки (КС) в соответствии со схемой маркировки лунок (п.7.2.1.1.).

Примечание: В случае дробного применения набор может быть использован только в течение шести месяцев после вскрытия компонентов набора.

¹Допускается постановка анализа на других автоматических анализаторах для ИФА открытого типа, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ИФА-общий IgE 2000» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: 8(812) 677-8779.

Основной состав:

- комплект из двенадцати 8-луночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к IgE человека, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к общему IgE 2000» — 1 упаковка;

- калибровочные пробы (КП) на основе водно-солевого раствора, содержащие известные количества общего IgE, аттестованные относительно Третьего международного стандарта «WHO International Standard Immunglobulin E (IgE), human serum» производства NIBSC. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; «Калибровочная проба №7»; точные значения концентраций общего IgE (в диапазоне 0-2000 МЕ/мл) в КП указаны на этикетках флаконов и/или в паспорте набора реагентов – 7 или 9* флаконов (по 0,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

- контрольная сыворотка на основе водно-солевого раствора, с известным содержанием общего IgE, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 или 2* флакона (по 0,5 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);

**Дополнительные флаконы калибровочных проб №3, №6 и контрольной сыворотки предназначены для рекалибрации по референсной калибровочной кривой при постановке на анализаторе «Alisei». За более подробной информацией обращайтесь к инструкции к анализатору «Alisei».*

- конъюгат моноклональных антител к IgE с пероксидазой хрена, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- водно-солевой раствор для разведения образцов, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3 мл);
- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р (20Х)» — 2 флакона (по 14 мл) или 1 флакон (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- раствор тетраметилбензидина, содержащий тетраметилбензидин, перекись водорода и стабилизаторы, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, 3,59% раствор соляной кислоты, маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл) или 1 флакон (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (Таблица 1);
- одноразовый наконечник – 16 шт. для комплектации №1;
- одноразовая ванночка – 2 шт. для комплектации №1.

Принадлежности:

- пакет закрывающийся полиэтиленовый (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт.

Таблица 1

Кат. номер		300-20	300-20А
Название компонента	Цветовая кодировка компонента	Комплектация №1	Комплектация №2
Комплект стрипов в рамке	-	1 шт	1 шт
Комплект калибровочных проб	Жидкости желтого цвета	7 фл по 0,5 мл	9 фл по 0,5 мл
Контрольная сыворотка	Жидкость желтого цвета	1 фл - 0,5 мл	2 фл по 0,5 мл
Конъюгат Е	Жидкость темно-розового цвета	1 фл - 18 мл	1 фл - 18 мл
Водно-солевой раствор для разведения образцов (Буфер Д)	Жидкость желтого цвета	1 фл - 3 мл	1 фл - 3 мл
Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (Буфер Р (20X))	Бесцветная жидкость	2 фл по 14 мл	1 фл - 50 мл
Раствор ТМБ	Бесцветная или светло-голубого цвета, или светло-бурого цвета жидкость	1 фл - 14 мл	1 фл - 14 мл
Стоп-реагент	Бесцветная жидкость	1 фл - 14 мл	1 фл - 50 мл
Одноразовый наконечник	-	16 шт	-
Одноразовая ванночка	-	2 шт	-

В комплект поставки входят: набор реагентов, принадлежности, инструкция по применению, паспорт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором «ИФА-общий IgE 2000» концентрация общего IgE в сыворотке крови человека не превышает 8 МЕ/мл.

3.2. Аналитическая специфичность. Определяется как способность теста обнаруживать только общий IgE в присутствии интерферирующих и перекрестно-реагирующих факторов в исследуемом материале. Повышение концентрации гемоглобина до 5 мг/мл, билирубина до 0,1 мг/мл, сывороточного альбумина до 50 мг/мл или триглицеридов до 15 мг/мл в некоторых пробах не оказывают негативного воздействия на результаты анализа с помощью набора «ИФА-общий IgE 2000», но не следует использовать гемолизированные или мутные образцы. Аналитическая специфичность по Панели предприятия для определения аналитической специфичности, аттестованной по СОП, составляет 100%. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с IgA, IgG и IgM человека по Панели предприятия для оценки влияния перекрестно-реагирующих факторов, аттестованной по СОП.

3.3. Коэффициент вариации концентрации в одном и том же образце при определении общего IgE с использованием набора «ИФА-общий IgE 2000» не превышает 8%. Внутрисерийная воспроизводимость не превышает 8%. Межсерийная воспроизводимость не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации общего IgE в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №3-№7 и составляет 90–110%.

Примечание: Так как содержащиеся в сыворотке крови человека антитела имеют гетерогенную природу, при разведении исследуемых образцов зависимость определяемой концентрации общего IgE от степени разведения в отдельных случаях может носить нелинейный характер.

3.5. Точность. Определяется в тесте на «открытие» — проверке соответствия значения определяемой концентрации общего IgE расчетной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы №3. Процент открытия в наборе «ИФА-общий IgE 2000» составляет 90–110%.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций. При использовании набора «ИФА-общий IgE 2000» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации общего IgE 10 000 МЕ/мл.

3.7. Клиническая проверка. Содержание общего IgE измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов у 156 здоровых лиц в возрасте 0–68 лет. Диапазон ожидаемых значений у здоровых лиц:

Таблица 2

Возрастные группы	IgE, МЕ/мл
до 1 года	0 – 15
от 1 года до 6 лет	0 – 60
от 6 до 10 лет	0 – 90
от 10 до 16 лет	0 – 200
от 16 до 68 лет	0 – 100

Диапазон ожидаемых значений зависит от многих факторов: специфичности метода, особенностей исследуемой популяции, точности метода в конкретной лаборатории. По этой причине каждой лаборатории рекомендуется использовать предоставленные изготовителем значения только до тех пор, пока специалистами лаборатории не будут определены диапазоны ожидаемых значений, характерных для конкретной популяции в месте расположения лаборатории.

Примечание: В наборе «ИФА-общий IgE 2000» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций в нг/мл необходимо значение концентрации в МЕ/мл умножить на 2,4.

3.8. Ограничение теста. Пробы пациентов, принимающих накануне сдачи крови лекарственные средства, употребляющих соленую, жирную и острую пищу, употребляющих алкоголь, подверженных стрессам и физическому перенапряжению, для анализа с помощью набора «ИФА-общий IgE 2000» использовать не рекомендуется.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а (согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ №4н от 06.06.2012 г.).

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2333-08 «Безопасность работы с

микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

4.4. Набор предназначен для профессионального применения персоналом, имеющим квалификацию для выполнения диагностических исследований *in vitro* после специального образования и обучения. Исследования могут выполнять специалисты не моложе 18 лет с высшим и средним медицинским, биологическим или иным образованием (врач КДЛ, биолог, медицинский технолог).

4.5. Перед началом работы ознакомиться с инструкцией и применять набор строго по назначению.

4.6. Стоп-реагент представляет собой 3,59% раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.7. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, разрешенные к применению на территории РФ, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.8. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Поскольку ИФА чувствителен к ионам металлов, контакт металлических предметов с компонентами набора недопустим.

4.9. Для обработки посуды и оборудования рекомендуется использовать дезинфицирующие средства, изготовленные на основе третичных аминов, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) или спиртов и разрешенные к применению на территории РФ. Использование дезинфицирующих средств на основе активного кислорода и лора возможно лишь на предстерилизационном этапе, с последующей термической стерилизацией.

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

4.11. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.12. Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.13. Все использованные одноразовые материалы и остатки образцов должны быть подвергнуты обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

4.14. После использования стрипы, контрольные или калибровочные пробы, образцы и все расходные материалы,

которые контактировали с образцами во время обработки, хранения или анализа (флаконы, перчатки, наконечники и т.д.) должны собираться отдельно и стерилизоваться в автоклаве с последующей утилизацией в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Вместо автоклавирования наконечники могут быть стерилизованы дезинфицирующим средством, после утилизированы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

4.15. Во время процедуры ручной промывки планшета содержимое лунок необходимо выбрасывать в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов.

4.16. Не использовать набор по истечении срока годности.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длинах волн 450 нм и 405 нм²;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C³;
- автоматическое промывочное устройство (вошер) для иммунологических планшетов^{3,3};

²Допускается использование автоматических анализаторов для ИФА открытого типа с аналогичными характеристиками, за информацией о необходимой комплектации набора и программе проведения анализа обращайтесь к производителю набора «ИФА-общий IgE 2000» в ООО «Компания Алкор Био», тел/факс: (812) 677-8779

³При использовании автоматического промывочного устройства необходимо тщательно следить за его состоянием, периодически проверять емкости и соединительные шланги для промывочных буферов на наличие микробиологического зароста и других загрязнений, проводить техническое обслуживание в соответствии с рекомендациями производителя оборудования

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными одноразовыми наконечниками⁵ с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 20–200 мкл; на 100–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными одноразовыми наконечниками⁴, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-500 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная или очищенная деионизованная⁵;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- дезинфицирующий раствор на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

Дополнительно для проведения анализа на анализаторе «Alisei»:

- автоматический иммуноферментный анализатор «Alisei»³;
- многоцелевые полипропиленовые пробирки⁶ 12x75 вместимостью 5 мл;
- концентрированный водный раствор Триала, 5000-кратный концентрат, маркирован «Триал»⁷.

⁴Повторное использование наконечников не допускается. При внесении каждого образца необходимо использовать новый наконечник

⁵В соответствии с ГОСТ 6709-72 «Вода дистиллированная. Технические условия» необходимо периодически контролировать качество воды, используемой для приготовления растворов

⁶Компоненты, не входящие в состав набора, поставляются по отдельному заказу

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. После центрифугирования сыворотку переносят в отдельную пробирку.

6.2. Для проведения анализа не разрешается использовать плазму крови, гемолизированную или мутную сыворотку, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

6.3. Образцы сыворотки крови разрешается хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более 5-ти суток; при необходимости более длительного хранения (до трех месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре -20°C и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

6.4. Перед проведением анализа образцы с концентрацией выше КП №6 (или КП №7) должны быть разведены буфером Д (см. п.7.1.10). Хранение разведенных образцов не допускается. При повторном исследовании тех же образцов сыворотки крови необходимо приготовить новое разведение.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагентов

7.1.1. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$) (далее КТ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

7.1.2. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка

готовы к использованию.

7.1.3. Конъюгат Е готов к использованию.**7.1.4. Буфер Д готов к использованию.****7.1.5. Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р (20X) развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 20 раз.**

Например: 14 мл буфера Р (20X) + 266 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.6. Раствор ТМБ готов к использованию.**7.1.7. Стоп-реагент готов к использованию.****7.1.8. Рабочий раствор Триала. Необходимое количество концентрированного раствора Триала развести дистиллированной или очищенной деионизованной водой в 5000 раз.**

Например: 1 мл Триала + 4999 мл воды. Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

7.1.9. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до КТ.**7.1.10. Разведение исследуемых образцов.**

Если по предварительным данным или по результатам анализа (см. п.9.4.) значения концентрации общего IgE в исследуемых образцах выше КП №6 (или КП №7), образцы следует развести буфером Д в 20 раз:

285 мкл буфера Д + 15 мкл исследуемого образца.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание. Разводить образцы следует только в день проведения анализа. При проведении анализа на анализаторе «Alisei» разведение исследуемых образцов также следует производить вручную.

7.2. Постановка анализа

7.2.1. Ручная постановка

На странице 31 приведена схема ручной постановки.

Ручную постановку анализа возможно проводить по двум вариантам протокола:

1) Протокол №1: для исследуемых образцов, где ожидаемые значения общего IgE менее номинала КП №6. Рекомендуется использовать набор калибраторов: КП №1, №2, №3, №4, №5, №6. В случае получения ОП образца более ОП КП №6 провести его разведение согласно п.7.1.10 и повторить анализ;

2) Протокол №2: для исследуемых образцов, где ожидаемые значения общего IgE более номинала КП №6. Рекомендуется использовать набор калибраторов: КП №1, №2, №3, №5, №6, №7. В случае получения ОП образца более ОП КП №7 провести его разведение согласно п.7.1.10 и повторить анализ;

Примечание: допускается проведение ручного анализа с использованием всех семи КП.

7.2.1.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать по одному из двух предложенных протоколов. Выбор протокола проведения анализа зависит от того какие концентрации общего IgE преимущественно определяются в исследуемых образцах конкретной лаборатории:

Протокол №1

A1, A2 — №1 — для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 — №2 — для измерения величины оптической плотности КП № 1;

C1, C2 — №3 — для измерения величины оптической плотности КП № 2;
D1, D2 — №4 — для измерения величины оптической плотности КП № 3;
E1, E2 — №5 — для измерения величины оптической плотности КП № 4;
F1, F2 — №6 — для измерения величины оптической плотности КП № 5;
G1, G2 — №7 — для измерения величины оптической плотности КП № 6;
H1, H2 — №8 — для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки;

Протокол №2

A1, A2 — №1 — для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;
B1, B2 — №2 — для измерения величины оптической плотности КП № 1;
C1, C2 — №3 — для измерения величины оптической плотности КП № 2;
D1, D2 — №4 — для измерения величины оптической плотности КП № 3;
E1, E2 — №5 — для измерения величины оптической плотности КП № 5;
F1, F2 — №6 — для измерения величины оптической плотности КП № 6;
G1, G2 — №7 — для измерения величины оптической плотности КП № 7;
H1, H2 — №8 — для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

7.2.1.2. Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата.

7.2.1.3. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся

лунки - по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

Примечание: В наборе «ИФА-общий IgE 2000» общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.

7.2.1.4. Инкубировать стрипы. Возможны 2 варианта инкубации:

- Инкубирование стрипов в течение 60 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37 °C со скоростью 400–800 об/мин;
- Инкубирование стрипов в течение 120 минут без шейкирования при КТ (предварительно встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 1–2 минут при комнатной температуре).

7.2.1.5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором на основе третичных аминов, ЧАС или спиртов и промыть лунки 5 раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п.7.1.5., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

7.2.1.6. Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировать стрипы.

Возможны 2 варианта инкубации с ТМБ:

- **Инкубирование стрипов в темноте в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37 °С со скоростью 400-800 об/мин.**
- **Инкубирование стрипов в течение 15-30 минут в темноте без шейкирования при КТ.**

7.2.1.7. Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхнуть рамку аккуратным постукиванием в течение 20-30 секунд или на шейкере в течение 1–2 минут при КТ.

7.2.1.8. Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п.7.2.1.7., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна не более 20 минут при КТ.

Примечание: Максимальная оптическая плотность не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная оптическая плотность не более 2,5 ед. ОП.

7.2.2. Постановка на анализаторе «Alisei»

Анализатор «Alisei» имеет полностью автоматизированный процесс проведения анализа: внесение реагентов, промывка, инкубирование, измерение оптической плотности, обработка результатов. Программа определения концентрации общего IgE с помощью набора «ИФА-общий IgE 2000» введена в память анализатора.



7.2.2.1. В случае **дробного** применения набора необходимо извлечь калибровочные пробы и контрольную сыворотку из автоматического анализатора после их внесения в лунки планшета и, плотно закрыв крышками, убрать в холодильник. Не допускается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности. Остальные жидкие реагенты убрать в холодильник сразу по окончании сессии. Эти ограничения обусловлены естественным испарением жидкостей, приводящим к получению некорректных результатов измерения при последующем использовании реагентов.

7.2.2.2. Для каждой новой серии набора реагентов необходимо построение нового калибровочного графика с концентрациями калибровочных проб, указанными на этикетках флаконов и в паспорте набора реагентов.

7.2.2.3. Не допускается рекалибрация по калибровочной кривой, полученной на наборе другой серии.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. После выполнения ручной постановки измерить на фотометре вертикального сканирования ОП в лунках при длине волны 450 нм (а так же при длине волны 405 нм, если используется Протокол №2, см. п.7.2.1.1).

При регистрации результатов необходимо вычитать среднюю величину ОП ТМБ, полученной в лунках А1 и А2, из значений ОП всех остальных лунок.

Примечание: Значение ОП в лунке с ТМБ не должно превышать 0,09 ед. ОП при 450 нм.

8.2. Критерии достоверности анализа

- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих КП №6, при 450 нм должно быть не менее 1,0 ед. ОП;

- среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих КП №7, при 405 нм должно быть не менее 0,5 ед. ОП;

- концентрация контрольной сыворотки должна находиться в диапазоне, указанном на этикетке соответствующего флакона и/или в паспорте набора реагентов.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ (только для ручной постановки)

9.1. Построить калибровочные графики зависимости оптических плотностей (ОП, ед. опт. плотн.) от концентрации общего IgE (МЕ/мл) в калибровочных пробах.

- В случае проведения анализа по протоколу №1 построить калибровочный график №1, используя измерения ОП калибровочных проб №1, №2, №3, №4, №5, №6 при 450 нм (см.График №1).

- В случае проведения анализа по протоколу №2 построить калибровочный график №2А, используя измерения ОП калибровочных проб №1, №2, №3, №5, №6, №7 при 450 нм (см.График №2А) и калибровочный график №2Б, используя измерения ОП калибровочных проб №1, №2, №3, №5, №6, №7 при 405нм (см.График № 2Б).

Внешний вид графиков зависит от способа преобразования осей.

Примечания: Для построения калибровочного графика рекомендуется использовать Программное обеспечение «ИФА Мастер», выбирая для аппроксимации зависимости функцию $4pL$.

Для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные ОП после вычитания из них средней величины ОП ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину ОП лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где B – среднее арифметическое значение ОП в лунках, содержащих КП или исследуемые образцы,

B_T — среднее арифметическое значение ОП лунок А1 и А2.

9.2. При проведении анализа по протоколу №1, определить содержание общего IgE в пробах по калибровочному графику №1. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию общего IgE умножить на фактор разведения.

9.3. При проведении анализа по протоколу №2, определить содержание общего IgE в пробах следующим образом:

- если значение оптической плотности пробы, измеренной при 450 нм, менее оптической плотности КП№6, то для вычислений следует использовать калибровочный график №2А;

- если значение оптической плотности пробы при длине волны 450 нм больше оптической плотности КП№6, вычисления производят по калибровочному графику №2Б. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию общего IgE умножить на фактор разведения.

9.4. Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации общего IgE, превышающих номинал

КП №6 (или КП №7 при 405 нм) не допускается. Для точного определения концентрации в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п.7.1.10.

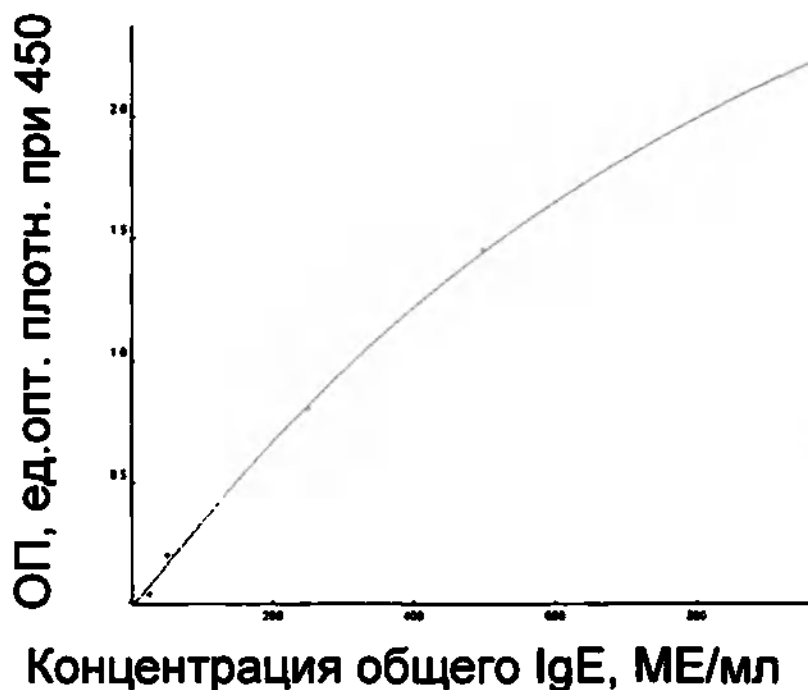


График 1. Типичный калибровочный график для протокола №1 (при 450 нм)

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

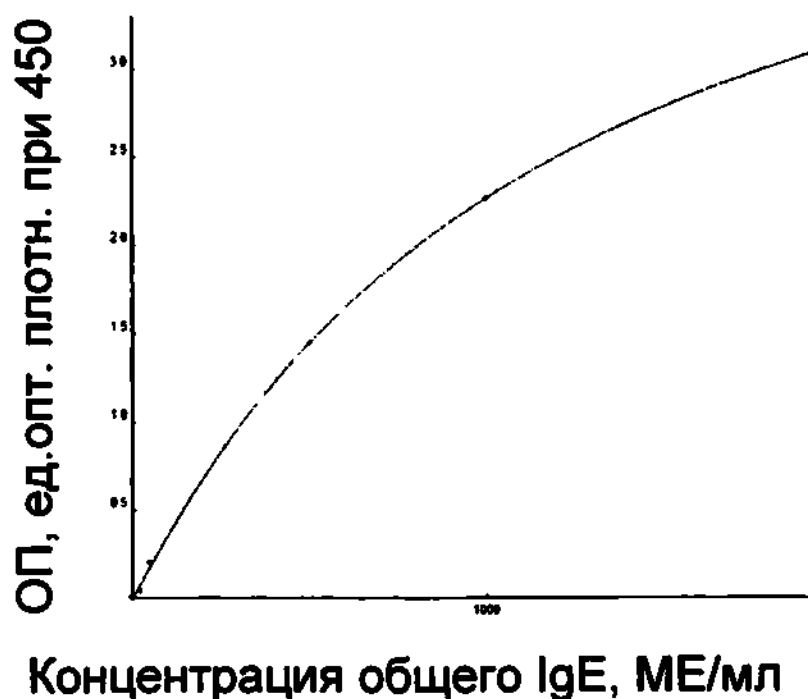
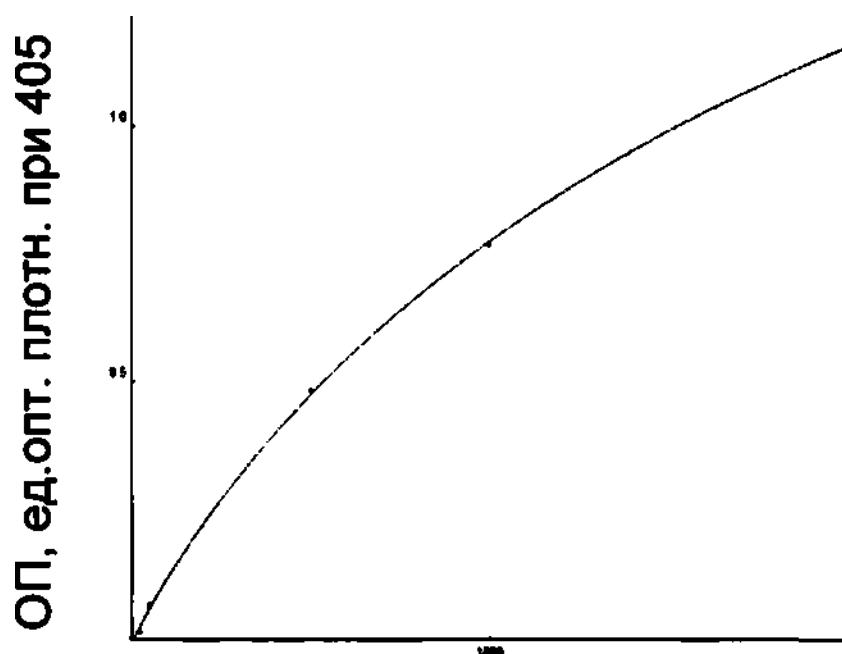


График 2А. Типичный калибровочный график для протокола №2 (при 450 нм)

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!



Концентрация общего IgE, МЕ/мл

График 2Б. Типичный калибровочный график для протокола №2 (при 405 нм)

Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор «ИФА-общий IgE 2000» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

Срок годности набора — 18 месяцев.

10.2. Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час, но не менее, чем за 30 минут до проведения анализа.

10.3. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пакет закрывающийся полиэтиленовый и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более шести месяцев;
- конъюгат, буфер Д и стоп-реагент, концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок и концентрированный раствор Триала после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- водно-солевой раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5-ти суток или при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более четырех недель;
- раствор Триала, подготовленный к использованию, хранить закрытым при КТ не более 5-ти суток;
- раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ не более шести месяцев.

10.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- для каждого независимого эксперимента при проведении анализа вручную необходимо определение ОП КП и ОП раствора ТМБ, построение нового калибровочного графика и определение концентрации общего IgE в контрольной сыворотке;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;

- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения;

- запрещается повторное использование калибровочных проб и контрольной сыворотки, находившихся на борту анализатора в течение всей сессии, вне зависимости от ее длительности.

10.5. Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящих в состав данного набора реагентов. Запрещается смешивать растворы ТМБ с различными буквенными обозначениями в сериях.

10.6. Запрещается использовать промывочный раствор, стоп-реагент и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Запрещается использовать промывочные растворы производства Алкор Био с буквенными обозначениями, отличными от указанного в инструкции к набору.

10.8. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.9. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

10.10. Таблица расхода реагентов (при постановке ИФА вручную)

Количество используемых стрипов	Конъюгат Е, мл	Промывочный раствор		Раствор ТМБ, мл	Стоп-реагент, мл
		Буфер Р (20Х), мл	Дистиллированная или очищенная деионизованная вода, мл		
3	4,5	7,0	до 140	3,5	3,5
4	6,0	9,3	до 186	4,7	4,7
5	7,5	11,7	до 234	5,8	5,8
6	9,0	14,0	до 280	7,0	7,0
7	10,5	16,3	до 326	8,2	8,2
8	12,0	18,7	до 374	9,3	9,3
9	13,5	21,0	до 420	10,5	10,5
10	15,0	23,3	до 466	11,7	11,7
11	16,5	25,7	до 514	12,8	12,8
12	18,0	28,0	до 560	14,0	14,0

11. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ

11.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре +2...8 °С.

Транспортирование изделий при температурах +2...8°С должно производиться в ёмкостях или при помощи холодильных установок, обеспечивающих регламентированный температурный режим.

Допускается транспортирование набора при температуре до +25°С не более 15 суток, в том числе при температуре +37°С не более 1 суток.

11.2. Набор, транспортированный с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

12. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

12.1. При утилизации отходов необходимо руководствоваться СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

12.2. При использовании набора образуются отходы образуются отходы классов А, Б и Г, которые утилизируются в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

13. ИНФОРМАЦИЯ О ПРОИЗВОДИТЕЛЕ

По вопросам качества набора «ИФА-общий IgE 2000» обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д. 40, лит. А, тел/факс: 8(812)677-8779.

14. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

	Только для <i>in vitro</i> диагностики		Количество тестов
	Номер по каталогу		Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
	Номер серии		Срок годности
	Производитель		Хранить при
	Дата изготовления		Биологический риск
	Ознакомьтесь с инструкцией		Беречь от влаги

Инструкция разработана в соответствии с ТУ 21.20.23-276-98539446-2018.

Примечания к Схеме проведения анализа (стр. 31):

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C);

ПО — программное обеспечение

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (только для ручной постановки)

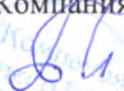
№	Стадия (операция)	Реагенты	Температура	Время	Примечания
1	Внесение реагентов	150 мкл конъюгата	КТ	Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15'	В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить
		20 мкл КП и КС			
		20 мкл исследуемых образцов			
2	Инкубация	—	+37°C	60'	Термостатируемый шейкер, 400 – 800 об/мин
			КТ	120'	Без оборудования (перед инкубацией перемешать 20-30 секунд постукиванием рамки или 1-2' в шейкере при КТ)
3	Промывка	300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)			1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р +266 мл H ₂ O
4	Внесение хромогена	100 мкл ТМБ			
5	Инкубация с ТМБ	—	+37°C	10'	Термостатируемый шейкер, 400 –800 об/мин
			КТ	15-30'	Без оборудования в темноте
6	Остановка ферментной реакции	100 мкл стоп-реагента			
7	Перемешивание	—	КТ	20-30"	Постукивание рамки
			КТ	1 – 2'	Шейкер
8	Регистрация результатов	—		В течение 20' после остановки ферментной реакции	Фотометр, 450 нм; 405 нм
9	Обработка результатов	—			Соответствующее ПО

Инструкция по применению «ИФА-общий IgE 2000»

В-02.2019-02

Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 31 (тридцать одна) лист

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»


Д.Г. Полынцев