

второй антигенной детерминантой связанных на твердой фазе молекул ИгЕ. Не связавшиеся компоненты анализируемых проб, а также избыток меченных МКАТ удаляют с твердой фазы повторными отмываниями. Активность пероксидазы на твердой фазе определяют по разложению субстрата - перекиси водорода. Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (тетраметилбензидина - ТМБ) в окрашенное производное, количество которого пропорционально ферментативной активности.

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

3. СОСТАВ НАБОРА

ТАБЛИЦА 1

Характеристика компонентов

<i>№ п/п</i>	<i>Шифр</i>	<i>Наименование компонента</i>	<i>Количество</i>	<i>Способ применения</i>
1	P1	Полистироловый 96-луночный наборный планшет с иммобилизованными МКАТ анти-ИгЕ	2 планшета (24 стрипа), упакованные по 6 стрипов в полиэтиленовые пакеты	Распечатать, поместить в рамку-держатель необходимое количество стрипов. Не рекомендуется хранить распечатанные стрипы
2		Рамка-держатель для стрипов	2 шт	
3	P2A	Калибровочная проба 0 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
4	P2Б	Калибровочная проба 5 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
5	P2B	Калибровочная проба 33 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
6	P2Г	Калибровочная проба 100 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
7	P2Д	Калибровочная проба 310 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
8	P2E	Калибровочная проба 560 кЕ/л	1 пробирка (0,06 мл)	Готова к употреблению
9	P3	Контрольная сыворотка с известным содержанием ИгЕ	1 фл. (0,25 мл)	Готова к употреблению
10	P4	Конъюгат МКАТ анти-ИгЕ с пероксидазой (100-кратный концентрат)	1 фл. (0,25 мл)	Развести в 100 раз промывающим раствором. Рабочий раствор КгЕ хранить не более 2 дней при температуре от +2 °С до +8 °С

11	P5	Промывающий раствор (трис-буфер, 10 кратный концентрат)	1 фл. (60 мл)	Развести в 10 раз дистиллированной водой. К одному объему P5 добавить 9 объемов дистиллированной воды. Готовый раствор хранить не более 10 дней при температуре от +2 °С до +8 °С
12	P6	Субстрат (перекись водорода)	1 фл. (12 мл)	Для приготовления раствора субстрат-хромогенной смеси взять в равных отношениях P6 и P7, учитывая, что на один стрип требуется 1 мл готовой смеси. Раствор стабилен 1 час после приготовления.
13	P7	Хромоген (ТМБ)	1 фл. (12 мл)	
14	P8	Стоп-реагент (1N H ₂ SO ₄)	1 фл. (12 мл)	Готов к употреблению
15		Масштабная бумага	1 шт.	
16		Трафарет для анализа	1 шт.	

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

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность анализа. Не выявлено перекрестной реакции моноклональных антител против ИгЕ с иммуноглобулинами А, G, М.

4.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ИгЕ в сыворотке крови человека не превышает 2,5 кЕ/л.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ИгЕ в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей ИгЕ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций от 5 до 560 кЕ/л и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» - соответствие измеренной концентрации ИгЕ предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 33 кЕ/л. Процент «открытия» составляет 90-110%.

4.5. Коэффициент вариации (КВ) результатов измерения содержания ИгЕ в одном и том же образце сыворотки крови человека с использованием набора не превышает 8%.

4.6. Диапазон определяемых концентраций ИгЕ составляет 5-560 кЕ/Л.

ТАБЛИЦА 2

Возрастные нормы концентрации ИгЕ в сыворотке крови человека:

Возраст	Концентрации ИгЕ(кЕ/л)
Новорожденные	0-2
Дети 3-6 месяцев	3-10
Дети 1 года	8-20
Дети 5 лет	10-50
Дети 10 лет	15-60
Взрослые	20-100

5. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

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

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

Замораживать только 1 раз. Повторное замораживание не допускается.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

6.1. Потенциальный риск применения набора - класс 2б.

6.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях, за исключением стоп-реагента (1 N раствор серной кислоты), являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Следует избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые стоп-реагента. В случае попадания стоп-реагента на кожу или слизистые покровы следует промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

6.3. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные сыворотки крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

7. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ:

- фотометр вертикального сканирования для 96-луночных планшетов, позволяющий производить измерение оптической плотности при длине волны 450 нм;

- пипетки полуавтоматические, варьирующие, со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объем жидкости 10-1000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (ошибка $\pm 3\%$);

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер);

- термостат, поддерживающий температуру $+37^{\circ}\text{C}$;

- холодильник бытовой;

- штатив;

- мерные колбы, цилиндры, мензурки вместимостью 25, 100, 250, 500 мл;

- центрифужные пробирки вместимостью 10 мл;

- бумага фильтровальная;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые.

8. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

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

8.2. Приготовить рабочие растворы так, как указано в разделе 3.

8.3. Поместить в рамку-держатель необходимое количество стрипов.

8.4. Составить схему расположения анализируемых образцов на прилагаемом трафарете.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Анализы следует проводить в дублях.

9.2. При отборе проб необходимо использовать одноразовые наконечники.

9.3. Время внесения проб в лунки одного планшета не должно превышать 15 минут, время инкубации необходимо исчислять от момента внесения реагента в последнюю лунку. Если анализы проводят на двух планшетах, то каждый планшет должен включать анализ калибровочных проб.

9.4. Пробы вносить в соответствии со схемой расположения на трафарете.

9.5. Компоненты набора вносить в лунки по стадиям в следующем порядке:

ТАБЛИЦА 3

9.5.1

Иммунологическая стадия I этап

Вносимые компоненты	Лунки, покрытые иммобилизованными анти – IgE (P1)		
	P2A-E	P3	НП
Калибровочные пробы P2A-E – «0», «5», «33», «100», «310», «560»	10 мкл		
Контрольная сыворотка P3		10 мкл	
Неизвестная исследуемая проба (НП)			10 мкл
Промывающий раствор (P5)	90 мкл	90 мкл	90 мкл

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

9.5.3. После внесения компонентов планшет накрыть крышкой и перемешать в ячейках на шейкере 1 минуту, либо путем осторожных покачиваний вручную. Время инкубации 1 час при 37 °С в термостате.

9.5.4. Отмывка

- Удалить жидкость из лунок путем стряхивания из перевернутого планшета.

- Немедленно заполнить лунки промывающим раствором по 150 мкл.

- Через минуту удалить жидкость путем стряхивания.

Процедуру повторить еще два раза.

ТАБЛИЦА 4

9.5.5

Иммунологическая стадия II этап

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти – IgE (P1)		
	P2A-E	P3	НП
Конъюгат МКАТ анти – IgE (P4)	100 мкл	100 мкл	100 мкл

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

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

9.5.8. Отмывка. Так же, как в п. 9.5.4. Процедуру отмывки проводить 3 раза. Затем дважды лунки стрипов промыть дистиллированной водой.

Удалить следы раствора путем стряхивания.

ТАБЛИЦА 5

9.5.9.

Ферментативная стадия

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти – IgE (P1)		
	P2A-E	P3	НП
Субстрат-хромогенная смесь (P6+P7)	100 мкл	100 мкл	100 мкл

9.5.10. Внести субстрат-хромогенную смесь (P6+P7) по 100 мкл в каждую лунку планшета.

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

ТАБЛИЦА 6

9.5.11.

Остановка реакции

Вносимые компоненты	Лунки с иммобилизованными МКАТ анти – IgE (P1)		
	P2A-E	P3	НП
Стоп-реагент 1 N раствор H ₂ SO ₄ (P8)	50 мкл	50 мкл	50 мкл

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

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

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

10. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1. Найти среднее арифметическое значение ОП для каждой пары калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов.

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

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

10.4. Построить калибровочную кривую на прилагаемой масштабной бумаге.

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

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

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

Общее время проведения анализа 3 часа.

11. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

11.1. Набор хранится при температуре от +2 °С до +8 °С в течение всего срока годности. Не замораживать!

11.2. Срок годности набора – 6 месяцев.

11.3. При нарушении условий хранения и схемы постановки анализа рекламации не принимаются.

11.4. В остальных случаях рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу учреждения-изготовителя: ООО НПО «Иммунотэкс», 355029, г. Ставрополь, ул. Ленина, 384, тел/факс (8652)28-37-93