



**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ
ОБЪЕДИНЕНИЕ «АЛЬТ»**

355011, Россия, Ставропольский край,
г. Ставрополь, а/я 1302
Телефон /факс/: (8652) 23-01-93
E-mail: alt_buh@mail.ru

Инструкция по применению

**Набора реагентов для иммуноферментного определения аллерген-
специфических IgE-антител в сыворотке крови
(IgE-АТ-ИФА)
для диагностики *in vitro***

по ТУ 9398-001-30430531-2011

*утверждена Приказом Росздравнадзора № 2350-Пр/12
от «15» мая 2012 г.*

Содержание.

1. Назначение.	3
2. Принцип метода.	3
3. Состав набора.	4
4. Аналитические характеристики набора.	5
5. Анализируемые образцы	5
6. Требования безопасности.	6
7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	8
8. Подготовка к анализу.	9
9. Проведение анализа.	9
10. Учет результатов.	11
11. Транспортирование и хранение	12
12. Указания по применению	13
13. Указания по утилизации	13
14. Гарантии производителя	14

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов IgE-АТ-ИФА предназначен для определения содержания аллергенспецифических IgE в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Определение аллергенспецифических IgE используется в клинической практике для диагностики аллергических заболеваний, вызванных пыльцевыми, бытовыми, пищевыми, грибковыми, бактериальными, лекарственными, профессиональными, инсектными аллергенами.

1.3. Набор рассчитан на проведение 192 (в компл. №1) или 288 (в компл. №2) определений, включая калибровочные пробы.

1.4. Набор предназначен для применения только *in vitro*.

2. Принцип метода.

Принцип метода – твердофазный неконкурентный непрямой иммуноферментный анализ. В наборе использованы моноклональные анти-IgE-антитела, входящие в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса иммуноглобулина E, которые аффинно взаимодействуют с аллергенами, сорбированными на поверхности полистиролового планшета. Несвязавшиеся компоненты анализируемой пробы и избыток конъюгата отмываются, а активность фермента в составе иммунных комплексов определяют с помощью тетраметилбензидина (ТМБ). Продукт реакции разложения превращает молекулы хромогена (ТМБ) в окрашенное производное голубого цвета. Ферментная реакция останавливается добавлением 1N раствора серной кислоты (стоп-реагента), происходит изменение цвета с голубого на желтый.

Оптическую плотность (ОП) окрасившегося продукта измеряют спектрофотометром вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Концентрация IgE в образце пропорциональна оптической плотности.

Для количественного выражения концентрации специфических IgE в лунки полистиролового планшета вносят калибровочные пробы с известными концентрациями специфических IgE (аттестованные по Второму Междуна-

родному Стандарту IgE человека IRP 75/502), которые анализируют одновременно с образцами пациента для получения калибровочной кривой. Неизвестные концентрации IgE в анализируемых образцах рассчитывают по данной кривой.

3. Состав набора.

Набор поставляется в двух вариантах комплектаций:

№	Шифр	Наименование	Ком- плектация №1	Комплекта- ция №2	Способ применения
1		Полистироловый 96-луночный наборный планшет в составе:	2 шт.	3 шт.	Готов к применению.
	P1	8-луночный стрип, покрытый анти-IgE-АТ (референс-стрип)	2 шт.	3 шт.	
	P3	Стрипы покрытые аллергенами	22 шт.	33 шт.	Готовы к применению.
2.	P2 0	Калибровочная проба 0, содержащая 0 КЕ/л	1 пробирка (0,07 мл)	1 пробирка (0,07 мл)	Готова к применению.
3.	P2D	Калибровочная проба D, содержащая 1 КЕ/л	1 пробирка (0,07 мл)	1 пробирка (0,07 мл)	Готова к применению.
4	P2C	Калибровочная проба C, содержащая 5 КЕ/л	1 пробирка (0,07 мл)	1 пробирка (0,07 мл)	Готова к применению.
5	P2B	Калибровочная проба B, содержащая 20 КЕ/л	1 пробирка (0,07 мл)	1 пробирка (0,07 мл)	Готова к применению.
6	P2A	Калибровочная проба A, содержащая 50 КЕ/л	1 пробирка (0,07 мл)	1 пробирка (0,07 мл)	Готова к применению.
7	P4	Конъюгат МКАТ анти-IgE с пероксидазой хрена, 1000-кратный концентрат	1 фл. (0,03 мл)	1 фл. (0,037 мл)	Развести в 1000 раз рабочим промывающим раствором. Рабочий раствор конъюгата хранить не более 2 дней при температуре от +2 ⁰ С до +8 ⁰ С
8	P5	Промывающий раствор, 10-кратный концентрат	1 фл. (30 мл)	2 фл. (30 мл)	Развести в 10 раз дистиллированной водой. К одному объему P4 добавить 9 объемов дистиллированной воды. Готовый раствор хранить не более 10 дней при температуре от +2 ⁰ С до +8 ⁰ С
9	P6	Тетраметилбензидин (ТМБ)	1 фл. (22 мл)	1 фл. (30 мл)	Готов к применению.
10	P7	Стоп-реагент	1 фл.	1 фл.	Готов

			(12 мл)	(18 мл)	к применению.
11		Трафарет для анализа	1 шт	1 шт	
12		Инструкция по применению	1 шт.	1 шт	
13		Паспорт	1 шт.	1 шт	

4. Аналитические характеристики набора.

Чувствительность набора (минимально определяемая концентрация) для IgE составляет не более 1 КЕ/л, что соответствует 1 классу RAST.

5. Анализируемые образцы.

5.1. Материалом для исследований служат негемолизированные прозрачные образцы сыворотки крови человека.

5.2. Забор крови для получения сыворотки осуществляют в процедурном кабинете с соблюдением установленных правил предосторожности, чтобы исключить возможность заражения ВИЧ-инфекцией и вирусом гепатита.

Сыворотку от сгустка следует отделить как можно быстрее, чтобы избежать гемолиза. Образцы сыворотки крови содержащие агрегаты или осадок, необходимо очистить центрифугированием.

Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т.к. может привести к получению ложноположительных и неправильных результатов.

5.3. Образцы сыворотки крови должны доставляться в контейнерах или в пробирках, герметично закрытых резиновыми или ватно-марлевыми, обернутыми полиэтиленовой пленкой, пробками.

5.4. Образцы необходимо хранить в условиях, предотвращающих микробную контаминацию не более 5 суток при температуре от +2 до +8°C. Допустимо однократное замораживание образцов при температуре до минус 20°C и последующее хранение в течение 5 месяцев.

Многократное замораживание-размораживание анализируемых образцов не допускается!

5.5. Все исследуемые образцы следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита, или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

При работе с анализируемыми образцам следует соблюдать «Инструкцию по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 года.

6. Требования безопасности.

Потенциальный риск применения набора - класс 2а.

6.1. Предупреждения и меры предосторожности.

- Набор реагентов предназначен только для диагностики *in vitro*.
- При работе с набором необходимо соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981г.).
- При работе с реагентами и пробами надевайте одноразовые резиновые перчатки и тщательно мойте руки после этого.
- Так как не существует методов, которые могут гарантировать полное отсутствие инфекционных агентов, обращайтесь с реагентами и образцами сыворотки крови, как с потенциально опасными! Следует соблюдать меры предосторожности, которые изложены в "Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" (утв. Минздравом СССР 17.01.1991).
- При работе с исследуемыми образцами материалы, контактирующие с ними, следует дезинфицировать согласно МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

- Избегайте контакта со стоп-реагентом (1N раствор серной кислоты), т.к. он обладает раздражающим действием и может вызвать раздражения кожи или ожоги. В случае попадания раствора серной кислоты на кожу и слизистые, необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.
- Некоторые реагенты содержат консервант 0,1% азид натрия - раздражающее кожный покров вещество. Необходимо избегать пролива или попадания брызг данного реагента на кожу или одежду. В случае контакта тщательно смыть мылом и водой.
- Пробы и использованные реагенты утилизируются, после деконтаминации, в канализационную сеть предприятия.
- Оборудование и химическая посуда, используемые в работе должны быть промаркированы и храниться отдельно.
- Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

6.2. Обеспечение получения достоверных результатов.

- Набор предназначен для использования только обученными и квалифицированными специалистами. Перед началом исследования внимательно прочитайте инструкцию по применению!

Достоверность результатов анализа зависит от выполнения следующих основных правил:

- Постановку иммуноферментного анализа следует проводить при комнатной температуре (от +18 до +25°C);
- Не использовать компоненты с истекшим сроком годности!
- При работе с набором нельзя использовать компоненты из наборов разных серий;
- Нельзя использовать компоненты других фирм-производителей!
- Перед использованием выдержать все компоненты набора при комнатной температуре (от +18 до +25°C) не менее 30 минут;

- Нельзя проводить анализ в присутствии реактивных паров (кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгата;
- Не используйте для дезинфекции исследуемых материалов и посуды средства, содержащие активный кислород и хлор, т.к. это приводит к искажению результатов;
- Не допускайте загрязнения компонентов набора, используйте чистую посуду, чистые одноразовые наконечники для каждого компонента и исследуемого образца. Предпочтительно применение материалов одноразового использования;
- Ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, не допускайте контакта металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;
- Не используйте одну и ту же емкость для разных растворов (ТМБ, стоп-реагент, конъюгат);
- Необходимо использовать только валидированные пипетки и оборудование;
- Необходимо использовать воду дистиллированную;
- Не подвергать реагенты воздействию высокой температуры и прямых солнечных лучей;
- Если при внесении образца допущена ошибка, повторное внесение образца после аспирации недопустимо;
- При промывке планшета необходимо соблюдать рекомендованное количество циклов промывки. Добивайтесь полного заполнения лунок, а затем аспирации, не допуская остатка жидкости в лунках. Неправильно проведенный этап промывки может привести к неточным результатам;
- Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

7. Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором:

- 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 объемы 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 $+37\pm 1^\circ\text{C}$;
- холодильник бытовой;
- штатив;
- мерные колбы и цилиндры вместимостью 25, 100, 250, 500 мл;
- центрифужные пробирки вместимостью 10 мл;
- бумага фильтровальная;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые хирургические;
- контейнер для дезинфекции.

8. Подготовка к анализу.

- 8.1. Перед работой извлечь набор из холодильника и выдержать его при комнатной температуре (от $+18$ до $+25^\circ\text{C}$) в течение времени не менее 30 минут. Перед использованием реагенты тщательно перемешать!
- 8.2. Приготовить рабочие растворы так, как указано в графе «способ применения» таблицы раздела 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. Пробы вносить в соответствии со схемой расположения на трафарете.
- ✓ 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.

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

9.3.1. Иммунная стадия (I этап)

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Калибровочные пробы P2 -«0», «1», «5», «20», «50»	10 мкл	
Неизвестная исследуемая проба (НП)		10 мкл
Рабочий промывающий раствор (P5)	90 мкл	

Примечание:

P1 - полистироловый 96-луночный наборный планшет [один 8-луночный стрип, покрытый анти-IgE-АТ (референс-стрип)];

P3 - стрипы покрытые аллергенами.

- Во все лунки планшета внести по 90 мкл рабочего промывающего раствора (**P5**);
- В лунки **P1** (референс-стрип) внести по 10 мкл калибровочных проб (**P2**);
- В остальные лунки (**P3**) внести по 10 мкл неизвестных исследуемых проб (**НП**);
- После внесения компонентов накрыть планшет крышкой и перемешать на шейкере в течение 1 минуты, либо путем осторожных покачиваний вручную. Время инкубации 1 час в термостате при температуре +37°С.

9.3.2. Отмывка.

- Удалить жидкость из лунок путем стряхивания из перевернутого планшета;
- Немедленно заполнить лунки рабочим промывающим раствором по 150 мкл в каждую лунку;
- Через 1 минуту удалить жидкость путем стряхивания.

Процедуру отмывки повторить еще два раза.

9.3.3. Иммунная стадия (II этап)

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Конъюгат МКАТ анти-IgE (P4)	100 мкл	

- Внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата МКАТ (**P4**) во все лунки планшета;
- Инкубировать планшеты в течение 1 часа в термостате при температуре +37°С.

9.3.4. Отмывка.

- Процедуру отмывки проводить 5 раз так же, как это указано в пункте 9.4.2;
- Удалить следы путем стряхивания.

9.3.5. Ферментативная стадия (III этап)

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>
ТМБ (P6)	100л	

- Внести по 100 мкл ТМБ (**P6**) в каждую лунку планшета;
- Инкубировать планшет в течение 5-15 минут в темном месте при комнатной температуре (от +18 до +25°С), периодически помешивая, в зависимости от степени развития голубого окрашивания.

9.3.6. Остановка реакции (IV этап)

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Стоп-реагент (P7)	50 мкл	

- Внести по 50 мкл стоп-реагента (**P7**) в каждую лунку планшета, содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет;
- Измерить оптическую плотность (ОП) в каждой лунке планшета при длине волны 450 нм в течение времени не более 5 минут после остановки реакции.

10. Учет результатов.

- ОП в лунках с калибровочной пробой **P2 0** (О КЕ/л) должна быть не более 0,1.

- ОП в лунках с калибровочной пробой **P2 A** (50 КЕ/л) должна быть не менее 1,5.
- Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации IgE в КЕ/л, по оси ординат - оптическую плотность при длине волны 450 нм.
- На калибровочном графике найти значения концентраций специфических IgE в анализируемых образцах.
- Полученные значения концентрации образцов необходимо интерпретировать согласно таблице:

Результат (мкг/мл)	Класс	Интерпретация
0 - 1	0	Отрицательный
1 - 5	1	Легкая аллергическая реакция
5 - 20	2	Умеренная аллергическая реакция
20 - 50	3	Высокая аллергическая реакция
>50	4	Очень высокая аллергическая реакция

Общее время проведения анализа 3 часа.

11. Транспортирование и хранение

11.1. Транспортирование наборов должно производиться всеми видами крытых транспортных средств в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре от +2 до +8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до +25°C не более 5 суток.

11.2. Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от +2 до +8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

11.3. Компоненты набора, можно хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы хранению не подлежат;

- калибровочные пробы после вскрытия флаконов можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 7 дней;
- конъюгат (100-кратный концентрат) после вскрытия флакона можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 1 месяца;
- концентрат промывающего раствора и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить при температуре от +2 до +8°C в течение всего срока годности набора;
- ТМБ после вскрытия флакона можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 2 месяцев;
- рабочий раствор конъюгата можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 2 дней;
- рабочий промывающий раствор можно хранить при температуре от +2 до +8°C не более 10 дней.

12. Указания по применению.

Набор должен применяться согласно инструкции, утвержденной Приказом Росздравнадзора № 2350-Пр/12 от «15» мая 2012 г.

- ✓ Запрещается использовать реагенты из наборов разных серий и других фирм-производителей.
- ✓ При каждом проведении исследований необходимо обязательно анализировать контрольные образцы.
- ✓ Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- ✓ Набор, пришедший в негодность, в том числе и в связи с истечением срока годности подлежит утилизации.

13. Указания по утилизации.

При утилизации отходов материалов и компонентов в процессе производства продукции и при обустройстве приточно-вытяжной вентиляции производственных помещений должны соблюдаться требования СанПиН 2.1.7.1322, СанПиН 2.1.7.1322-03, а также требования по охране природы согласно ГОСТ 12.1.005, ГОСТ 17.1.1.01, ГОСТ 17.1.3.13, ГОСТ 17.2.3.02 и ГОСТ 17.2.1.04.

- ✓ Использованные компоненты набора, анализируемые образцы, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей утилизируют по классу Б, как эпидемиологические опасные отходы (СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»).
- ✓ Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют следующим образом:
 - промывающий раствор, 10-кратный концентрат, трафарет для анализа, инструкция по применению; паспорт, упаковочная коробка с ложементом утилизируются как отходы класса А (эпидемиологические безопасные отходы, СанПиН 2.1.7.2790-10);
 - планшеты, пробирки с калибровочными пробами и конъюгатом утилизируют как отходы класса Б (эпидемиологические опасные отходы, СанПиН 2.1.7.2790-10);
 - тетраметилбензидин (ТМБ), стоп-реагент утилизируются как отходы класса Г (токсикологически опасные отходы 4-го класса опасности, СанПиН 2.1.7.2790-10).

14. Гарантии производителя.

14.1. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных настоящими техническими условиями.

14.2. Срок годности набора - 6 месяцев со дня приемки ОБТК предприятия-изготовителя.

По вопросам, касающимся качества набора IgE-АТ-ИФА, следует обращаться в ООО НПО «Альт» по адресу: 355011, г. Ставрополь, а/я 1302, тел/факс: (8652) 23-01-93, 99-08-09.