



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

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
аллергенспецифических IgG- IgG₄-антител в сыворотке крови
(IgG-IgG₄-АТ-ИФА)
для диагностики in vitro

по ТУ 9398-002-30430531-2011
утверждена Приказом Росздравнадзора №1608-Пр/12
от «5» апреля 2012 г.

Содержание.

1.	Назначение	3
2.	Принцип метода	3
3.	Состав набора	4
4.	Аналитические характеристики набора	7
5.	Анализируемые образцы	7
6.	Требования безопасности	8
7.	Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором	10
8.	Подготовка к анализу	11
9.	Проведение анализа	11
10.	Учет результатов	14
11.	Транспортирование и хранение	15
12.	Указания по применению	15
13.	Указания по утилизации	16
14.	Гарантии производителя	16

1. Назначение.

1.1. Набор реагентов IgG-IgG₄-АТ-ИФА предназначен для определения содержания аллергенспецифических IgG и IgG₄ в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

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

1.3. Набор рассчитан на 192 определения, 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-IgG- и анти-IgG₄-антитела, входящие в пероксидазный конъюгат, способный выявлять в сыворотке крови человека антитела класса иммуноглобулина G, 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 IgG и IgG₄ в образце пропорциональна оптической плотности.

Для количественного выражения концентрации специфических IgG/IgG₄ в лунки полистиролового планшета вносят калибровочные пробы с известными концентрациями специфических IgG/IgG₄ (калиброванные по Международному Стандарту ВОЗ 67/086), которые анализируют одновременно с образцами

пациента для получения калибровочной кривой. Неизвестные концентрации IgG/IgG₄ в анализируемых образцах рассчитывают по данной кривой.

3. Состав набора.

Набор поставляется в трех вариантах исполнения:

№	Шифр	Наименование	Количество, объем			Способ применения
			Комплектация №1	Комплектация №2	Комплектация №3	
1.		<i>Полистироловый 96-луночный наборный планшет в составе:</i>	1 шт.	2 шт.		Готов к применению.
	P1	8-луночный стрип, покрытый анти-IgG-АТ (референс-стрип)	1 шт.	2 шт.		
	P3	Стрипы покрытые аллергенами	11 шт.	22 шт.		
2.		<i>Полистироловый 96-луночный наборный планшет в составе:</i>	1 шт.		2 шт.	Готов к применению.
	P1*	8-луночный стрип, покрытый анти-IgG ₄ -АТ (референс-стрип)	1 шт.		2 шт.	
	P3*	Стрипы покрытые аллергенами	11 шт.		22 шт.	
		<i>Калибровочные пробы для определения IgG:</i>				Готовы к применению.
3.	P2 0	Калибровочная проба 0, содержащая 0 мкг/мл	1 пробирка (0,05 мл)	1 пробирка (0,07 мл)		
4.	P2 D	Калибровочная проба D, содержащая 0,5 мкг/мл	1 пробирка (0,05 мл)	1 пробирка (0,07 мл)		
5.	P2 C	Калибровочная проба C, содержащая 1 мкг/мл	1 пробирка (0,05 мл)	1 пробирка (0,07 мл)		
6.	P2 B	Калибровочная проба B, содержащая 2 мкг/мл	1 пробирка (0,05 мл)	1 пробирка (0,07 мл)		
7.	P2 A	Калибровочная проба A, содержащая 5 мкг/мл	1 пробирка (0,05 мл)	1 пробирка (0,07 мл)		
		<i>Калибровочные пробы для определения IgG₄</i>				Готовы к применению.
8.	P2 0*	Калибровочная проба 0, содержащая 0 нг/мл	1 пробирка (0,05 мл)		1 пробирка (0,07 мл)	
9.	P2 D*	Калибровочная проба D*, содержащая 15 нг/мл	1 пробирка (0,05 мл)		1 пробирка (0,07 мл)	
10.	P2 C*	Калибровочная проба C*, содержащая 50	1 пробирка (0,05 мл)		1 пробирка (0,07 мл)	

		нг/мл				
11.	P2B*	Калибровочная проба В* содержащая 150 нг/мл	1 пробирка (0,05 мл)		1 пробирка (0,07 мл)	
12.	P2A*	Калибровочная проба А*, содержащая 500 нг/мл	1 пробирка (0,05 мл)		1 пробирка (0,07 мл)	
13.	P4	Конъюгат МКАТ анти-IgG, 100-кратный концентрат	1 фл. (0,15 мл)	1 фл. (0,3 мл)		Развести в 100 раз рабочим промывающим раствором. Рабочий раствор КгG хранить не более 2 дней при t от +2 ⁰ С до +8 ⁰ С
14.	P4*	Конъюгат МКАТ анти-IgG ₄ , 100-кратный концентрат	1 фл. (0,15 мл)		1 фл. (0,3 мл)	Развести в 100 раз рабочим промывающим раствором. Рабочий раствор КгG ₄ хранить не более 2 дней при t от +2 ⁰ С до +8 ⁰ С
15.	P5	Промывающий раствор, 10-кратный концентрат	1 фл. (30 мл)	1 фл. (30 мл)	1 фл. (30 мл)	Развести в 10 раз дистиллированной водой. К одному объему Р4 добавить 9 объемов дистиллированной воды. Готовый раствор хранить не более 10 дней при t от +2 ⁰ С до +8 ⁰ С
16.	P6	Тетраметилбензидин (ТМБ)	1 фл. (22 мл)	1 фл. (22 мл)	1 фл. (22 мл)	Готов к применению.
17.	P7	Стоп-реагент	1 фл. (12 мл)	1 фл. (12 мл)	1 фл. (12 мл)	Готов к применению.
18.		Трафарет для анализа	1 шт	1 шт	1 шт	
19.		Инструкция по применению	1 шт	1 шт	1 шт	
20.		Паспорт	1 шт	1 шт	1 шт	

4. Аналитические характеристики набора.

Чувствительность набора (минимально определяемая концентрация) для IgG составляет не более 0,5 мкг/мл, для IgG₄- не более 15 нг/мл.

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 $+37 \pm 1$ °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 извлеките набор из холодильника и выдержите его при комнатной температуре (от $+18$ до $+25$ °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)

IgG

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1</i>	<i>P3</i>
Калибровочные пробы P2 -«0», «0,5», «1», «2», «5»	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-IgG-АТ (референс-стрип)];

P3 - стрипы покрытые аллергенами.

IgG₄*

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1*</i>	<i>P3*</i>
Калибровочные пробы P2* - «0», «15», «50», «150», «500»	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-IgG₄-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/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°C.

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)

IgG

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

IgG₄

<i>Вносимые компоненты</i>	<i>P1*</i>	<i>P3*</i>
Конъюгат МКАТ анти-IgG ₄ (P4*)	100 мкл	

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

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)

IgG

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

IgG₄

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

- 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°C), периодически помешивая, в зависимости от степени развития голубого окрашивания.

9.4.6. Остановка реакции (IV этап)

IgG

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

IgG₄

<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/P2 0*** должна быть не более 0,1.
- ✓ ОП в лунках с калибровочной пробой **P2 A/P2 A*** должна быть не менее 1,5.
- ✓ Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации IgG в мкг/мл, по оси ординат - оптическую плотность при длине волны 450 нм.
- ✓ Построить калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрации IgG₄ в нг/мл, по оси ординат - оптическую плотность при длине волны 450 нм.
- ✓ На калибровочных графиках найти значения концентраций специфических IgG/IgG₄ в анализируемых образцах.
- ✓ Полученные значения концентрации образцов необходимо интерпретировать согласно таблице:

IgG

Результат (мкг/мл)	Класс	Интерпретация
0 - 0,5	0	Отрицательный

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

IgG₄

Результат (нг/мл)	Класс	Интерпретация
0-15	0	Отрицательный
15-50	1	Легкая аллергическая реакция
50-150	2	Умеренная аллергическая реакция
150-500	3	Высокая аллергическая реакция
>500	4	Очень высокая аллергическая реакция

10.6. 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;
- конъюгаты (100-кратные концентраты) 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 конъюгатов 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 №1608-Пр/12 от «5» апреля 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 IgG-IgG₄-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.