УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
здравоохранения Республики
Беларусь
_____ В. Е. Шевчук
11 12 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

ИФА-общий IgE

Комплект 1

(в соответствии с договором № 290- МТ)

Дело № 13879 от "07" марта 2012 г.

СОГЛАСОВАНО
Зам директора
РУП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении"
_____ С.И. Зинченко
13 12 2012 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
УЗ «Минский консультационно-диагностический центр»
_____ А.В. Толкачев
_____ 2012 г.

СОГЛАСОВАНО
Ректор
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
_____ Ю.Е. Демидчик
12 12 2012 г.

СОГЛАСОВАНО
Главный врач
ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»
_____ С.С. Корытько
13 12 2012 г.

РАЗРАБОТАНО
Генеральный директор
СП ООО «Фармлэнд»
_____ В.В. Сенчук
04 03 2012 г.

2012

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1 Назначение набора

1.1 Набор предназначен для количественного определения концентрации общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови "in vitro" методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2 IgE — класс иммуноглобулинов, содержание которого 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 антигельминтозном иммунитете. При аскаридозе обнаруживается 15–20-кратное повышение концентрации IgE. Однако 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 дифференцировать аллергические заболевания среди множества патологий, клинически проявляющихся как астма, частые заболевания дыхательных путей, хронические риниты и дерматиты. Повышенные концентрации IgE в сыворотке крови отмечают также при гипер-IgE синдроме, лимфосаркоме.

2 Характеристика и принцип работы набора

2.1 Состав набора:

Наименование компонента	Количество
Иммуносорбент	1 комплект
Калибровочная проба C_0	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_1	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_2	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_3	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_4	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Калибровочная проба C_5	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Контрольная сыворотка	1 флакон; 0,5 мл или 1 флакон, лиофилизованный препарат
Конъюгат **(Кг)**	1 флакон; 18 мл
Раствор для разведения сыворотки **(РР-С)**	1 флакон; 3 мл
20-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином **(ФСБ-Т×20)**	2 флакона по 14 мл
Раствор тетраметилбензидина **(Раствор ТМБ)**	1 флакон, 14 мл
Стоп-реагент	1 флакон; 14 мл
Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки	1 пакет
Примечания 1 Точные значения концентрации IgE в калибровочных пробах и контрольной сыворотке указаны на этикетках флаконов. 2 Закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки входит в состав набора при упаковывании иммуносорбента в пакет из 2-слойного полиэтилена.	

2.2 Основные компоненты набора «ИФА-общий IgE» – иммуносорбент и конъюгат.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Иммуносорбент представляет собой комплект из двенадцати восьмилуночных полистирольных стрипов, в лунках которых сорбированы мышиные моноклональные антитела к общему IgE.

Конъюгат представляет собой мышиные моноклональные антитела к общему IgE человека, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Калибровочные пробы – на основе сыворотки крови крупного рогатого скота или водно-солевого раствора, содержащие известные количества общего IgE, аттестованные по Второму международному референсному препарату для общего IgE WHO 75/502. Ориентировочные значения концентраций общего IgE в калибровочных пробах – 0; 10; 50; 100; 250; 500 МЕ/мл.

Контрольная сыворотка – на основе сыворотки крови человека или водно-солевого раствора с известным содержанием общего IgE.

2.3 Принцип работы набора. В наборе «ИФА-общий IgE» 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 анти-IgE-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация IgE, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-IgE-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации IgE. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству IgE в исследуемом образце (Рис.1).

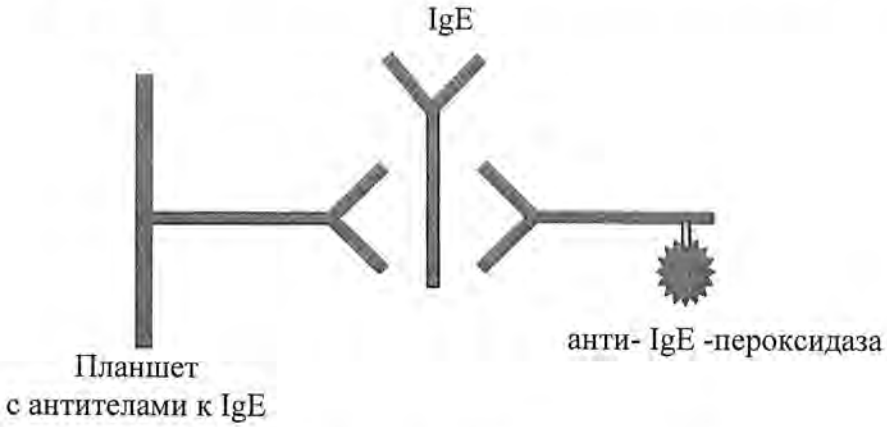


Рисунок 1 – Схема анализа

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.

2.4 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения оптической плотности (ОП) раствора ТМБ. Всего – **96 определений** при использовании всех стрипов одновременно.

Набор рассчитан на **4 постановки** иммуноферментного анализа: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки).

Примечание – *В случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

2.5 Набор позволяет определять концентрацию IgE в сыворотке крови человека **в диапазоне от 2,3 до 500,0 МЕ/мл.**

2.6 Продолжительность анализа составляет **1 ч 45 мин**.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3 Меры предосторожности при работе с набором

3.1 Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными. Однако работа со всеми исследуемыми образцами сыворотки (плазмы) крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита В или любой другой возбудитель вирусной инфекции, с отработанными растворами и жидкостями, различным оборудованием, которое может быть загрязнено в процессе анализа, требует определенных мер безопасности при использовании набора:

- работу необходимо проводить в специально оборудованном помещении;
- работать необходимо с применением средств индивидуальной защиты и с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], и [3].

3.2 Стоп-реагент, представляет собой 1Н раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо немедленно промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

3.3 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 Все лица, работающие в лаборатории с наборами, должны проходить обязательный медицинский осмотр в соответствии с требованиями [4].

3.5 Утилизация медицинских отходов и/или неиспользованных наборов с истекшим сроком годности должна производиться в соответствии с требованиями [5].

4 Правила работы с набором

4.1 Для исключения ложных результатов исследуемые образцы сыворотки крови человека необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Необходимо осветлять образцы сыворотки крови человека, содержащие агрегированные компоненты сыворотки или осадок, при помощи центрифугирования в течение 5 мин при скорости вращения (1000-1500) об/мин. Образцы сыворотки крови человека можно хранить при температуре (2-8) °С не более 48 ч. При необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре минус 20 °С и ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

Для проведения анализа не следует использовать плазму крови человека, образцы сыворотки крови человека с гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, содержащие азид натрия, а также длительно хранившиеся без замораживания.

Надежность результатов зависит от выполнения следующих правил:

- не допускается использование набора после окончания срока годности, а также смешивание компонентов наборов разных серий;
- для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость;
- вся используемая для приготовления реагентов посуда должна быть тщательно вымыта и сполоснута дистиллированной водой;
- необходимо обратить внимание на тщательное перемешивание реагентов;
- запрещается возвращать избыток Кг, раствора 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;
- каждый образец сыворотки крови человека, а также реагенты набора необходимо отбирать отдельным наконечником.
- не допускается подсыхание лунок на всех этапах постановки ИФА;
- необходимо использовать пипетки полуавтоматические со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3 %);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- во время проведения анализа следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочую поверхность.

4.2 При вскрытии и растворении лиофилизованных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

4.3 При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что **для каждого** независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и **рекомендуется** определение концентрации IgE в контрольной сыворотке.

5 Оборудование и материалы, необходимые для проведения анализа

5.1 Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при длине волны 450 нм;

- термостатируемый шейкер, позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний (3-4) мм и частотой (8-13) Гц ((400-800) об/мин) при температуре 37 °С;
- холодильник бытовой, поддерживающий температуру (2-8) °С;
- полу- или автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер);
- пипетки одноканальные автоматические переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,05 до 5,0 мл (от 5 до 5000 мкл);
- пипетки 8-ми канальные автоматические переменного объема со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 0,3 мл (до 300 мкл);
- мерный цилиндр вместимостью 500 мл;
- ванночки для реагентов или чашки Петри (диаметр 100 мм);
- пробирки одноразовые с пробками вместимостью 3 мл или флаконы стеклянные вместимостью (10-15) мл;
- штатив для пробирок;
- вата медицинская гигроскопическая;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые хирургические;
- раствор с объемной долей этилового спирта 70 %;
- раствор с массовой долей перекиси водорода 6 %;
- вода дистиллированная или деионизированная;
- контейнер для сбора твердых отходов;
- контейнер для слива жидких отходов.

6 Подготовка к проведению анализа

6.1 Набор реагентов перед проведением анализа извлечь из холодильника, открыть крышку коробки и выдержать компоненты набора при температуре **(18-25) °С** в течение **30 мин**, но не более 1 ч.

Внимание! Все образцы сывороток и реагенты перед проведением анализа тщательно перемешать!

6.2 Подготовка иммуносорбента

Вскрыть пакет и установить на рамку необходимое количество стрипов иммуносорбента. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковывании иммуносорбента в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в закрывающийся пакет из полиэтиленовой пленки и герметично закрыть.

Стрипы иммуносорбента можно хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

6.3 Подготовка растворов калибровочных проб и контрольной сыворотки

Для восстановления лиофилизованных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или пробкам. Открыть флаконы и положить пробки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по **0,5 мл** (500 мкл)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

дистиллированной воды. Флаконы закрыть пробками, выдержать в течение 10 мин при температуре (18-25) °С и аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая образования пены. В течение следующих 10 мин выдержать флаконы при температуре (18-25) °С, периодически перемешивая их содержимое.

Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Растворенные калибровочные пробы и контрольную сыворотку, а также вскрытые флаконы с жидкими калибровочными пробами и контрольной сывороткой можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.4 Приготовление раствора для промывания планшета

В мерный цилиндр вместимостью 500 мл внести содержимое флакона с ФСБ-Т×20, затем добавить дистиллированной воды до метки **280 мл** и аккуратно перемешать раствор, избегая образования пены.

В случае использования одного или несколько стрипов содержимое флакона с ФСБ-Т×20 интенсивно встряхнуть в течение (20-30) с, отобрать необходимое количество ФСБ-Т×20 в мерный стакан или цилиндр и развести его дистиллированной водой в **20 раз**.

Пример – В мерный цилиндр внести 5 мл ФСБ-Т×20 и 95 мл дистиллированной воды, перемешать раствор, избегая образования пены.

Раствор для промывания планшета можно хранить закрытым при температуре (2-8) °С не более 5 суток.

Неиспользованный ФСБ-Т×20 можно хранить в закрытом флаконе при температуре (2-8) °С в течение срока годности набора.

6.5 Подготовка Кг, РР-С и раствора ТМБ

Кг, РР-С и раствор ТМБ готовы к использованию. Расход Кг на один стрип (8 лунок) составляет 1,5 мл; расход раствора ТМБ на один стрип – 1,15 мл.

После вскрытия флаконов растворы можно хранить при температуре (2-8) °С не более 1 месяца.

6.6 Подготовка стоп-реагента

Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

После вскрытия флакона раствор можно хранить при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности.

6.7 Подготовка проб исследуемых образцов сыворотки крови человека

Если значения концентрации IgE в исследуемых образцах сыворотки крови по предварительным данным **превышает значение концентрации калибровочной пробы C_5**, МЕ/мл, то исследуемые образцы следует развести РР-С в **20 раз**.

Пробирки для разведения исследуемых образцов сыворотки крови человека поместить в штатив и маркировать следующим образом: №1, №2 и т.д.

Пример

1 Образец № 1 (разведение в 20 раз): в пробирку, маркированную «№ 1», внести 0,19 мл (190 мкл) РР-С и 0,01 мл (10 мкл) исследуемого образца сыворотки крови, тщательно перемешать раствор, избегая образования пены.

Внимание! Разводить образцы сыворотки крови следует только в день проведения анализа. При повторной постановке тех же образцов сыворотки крови человека необходимо делать новое разведение.

7 Требования к промыванию планшета

7.1 Для промывания планшета рекомендуется использовать автоматический или полуавтоматический промыватель – вошер; в случае отсутствия вошера можно промывать лунки 8-канальной пипеткой;

- на всех этапах промывания необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление (аспирацию) жидкости из них;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- необходимо при каждом промывании все лунки заполнить раствором до краев (0,30-0,35 мл в лунку), без переполнения и перетекания жидкости из соседних лунок, встряхнуть планшет на шейкере в течение (5-10) с с последующим декантированием;

- при каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамкой со стрипами в перевернутом положении по сложенной в несколько раз фильтровальной бумаге, положенной на лист полиэтилена;

- некачественное промывание планшета приводит к получению некорректных результатов.

8 Проведение анализа

8.1 Составить протокол маркирования лунок в соответствии с рисунком 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМБ	ТМБ	№1									
B	C_0	C_0	№1									
C	C_1	C_1	№2									
D	C_2	C_2	№2									
E	C_3	C_3	№3									
F	C_4	C_4	№3									
G	C_5	C_5	№4									
H	КС	КС	№4									

Рисунок 2

Лунки маркировать следующим образом:

- A1, A2 — для измерения величины ОП раствора ТМБ;
- B1, B2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_0;
- C1, C2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_1;
- D1, D2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_2;
- E1, E2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_3;
- F1, F2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_4;
- G1, G2 — для измерения величины ОП калибровочной пробы C_5;
- H1, H2 — для измерения величины ОП контрольной сыворотки (КС);
- A3,B3 - …. — для измерения величины ОП образцов исследуемых сывороток крови человека №1 - ….

8.2 Внести во все лунки стрипов иммуносорбента, кроме лунок A1 и A2, по **0,15 мл** (150 мкл) Кг.

8.3 Внести **в дубликатах** в соответствующие лунки стрипов иммуносорбента по **0,02 мл** (20 мкл) калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки – по **0,02 мл** (20 мкл) проб исследуемых образцов сыворотки крови.

Внимание! *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и проб исследуемых образцов сыворотки крови не должно превышать 15 мин, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам!*

8.4 Инкубировать планшет на **термостатируемом шейкере** со скоростью (500-800) об/мин при температуре **(37±1) °С в течение 1 ч 30 мин** либо в термостате при температуре **(37±1) °С в течение 2 ч 15 мин**.

8.5 Удалить содержимое лунок с помощью промывателя в контейнер с дезинфицирующим раствором, затем промыть лунки планшета раствором для промывания планшета (п 6.4) **пять раз**.

8.6 Внести немедленно во все лунки по **0,1 мл** (100 мкл) раствора ТМБ и инкубировать планшет **в защищенном от света месте** при температуре **(18-25) °С** в течение **(15-30) мин** ***в зависимости от степени развития окраски*** или на **термостатируемом шейкере** со скоростью (500-800) об/мин при температуре **(37±1) °С в течение 10 мин.**

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.7 Остановить реакцию путем внесения во все лунки стрипов иммуносорбента по **0,1мл** (100 мкл) стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ.. Планшет встряхнуть на шейкере в течение **(1-2) мин**.

Внимание! В лунках планшета иммуносорбента с образцами, содержащими IgE, произойдет изменение окраски раствора с голубой на желтую различной интенсивности.

Примечание – *Максимальная ОП не должна превышать пределов линейного измерения спектрофотометра. Рабочий диапазон спектрофотометра необходимо уточнять в паспорте прибора. Рекомендуемая максимальная ОП – не более 2,5 ОЕ.*

8.8 Не позже чем через 1 мин после остановки реакции, определить ОП в лунках стрипов иммуносорбента в одноволновом режиме при длине волны **450 нм**.

В случае невозможности по техническим причинам своевременно измерить ОП растворов в лунках на фотометре, планшет можно хранить при температуре **(2-8) °С не более 20 мин**.

8.9 Схема анализа приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема проведения анализа

Стадия анализа и реагенты	Номер **пары лунок** в соответствии с протоколом маркировки лунок по п 8.1								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9-48
Конъюгат Е, мкл	–	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**	**150**
КП C_0, мкл	–	**20**	–	–	–	–	–	–	–
КП C_1, мкл	–	–	**20**	–	–	–	–	–	–
КП C_2, мкл	–	–	–	**20**	–	–	–	–	–
КП C_3, мкл	–	–	–	–	**20**	–	–	–	–
КП C_4, мкл	–	–	–	–	–	**20**	–	–	–
КП C_5, мкл	–	–	–	–	–	–	**20**	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	**20**	–
C_X, мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	**20**
Инкубация №1	**(37±1) °С, термостатируемый шейкер, 1 ч 30 мин** либо **(37±1) °С, термостат, 2 ч 15 мин**								
5-кратная промывка: промывочный буферный раствор, мкл	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300	5× 300
Раствор ТМБ, мкл	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
Инкубация №2	**(18-25)° С, (15-30) мин,** либо **(37±1) °С, термостат, 10 мин** ***место, защищенное от света***								
Стоп-реагент, мкл	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
Перемешивание	(18-25)° С, шейкер, (1-2) мин								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов иммуносорбента, ОЕ	Спектрофотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

Примечания
1 КП – калибровочная проба;
2 КС – контрольная сыворотка;
3 C_X – анализируемые пробы.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9 Обработка результатов анализа

9.1 Если программа фотометра позволяет вычитать среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2 из значений ОП растворов всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину В — среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сыворотки крови, ОЕ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой $B–B_T$, где B_T — среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2, ОЕ; В — среднее значение ОП растворов в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы образцов сыворотки крови, ОЕ.

Примечание - Среднее арифметическое значение ОП растворов в лунках А1 и А2 не должно превышать 0,09 ОЕ.

9.2 Рассчитать величину В, ОЕ, для каждой пары лунок, содержащих калибровочные пробы, контрольную сыворотку, пробы исследуемых образцов сыворотки крови.

9.3 В линейных координатах построить для калибровочных проб график зависимости величины В, ОЕ, от концентрации IgE в калибровочных пробах, МЕ/мл, откладывая на оси ординат значения ОП, ОЕ, а по оси абсцисс – значения концентраций IgE, МЕ/мл, в соответствующих калибровочных пробах (Рис. 2).

Внимание! Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!

9.4 Определить по калибровочному графику концентрацию IgE в пробах исследуемых образцов сыворотки крови, МЕ/мл. В случае дополнительного разведения образцов сыворотки крови необходимо измеренную концентрацию IgE умножить на фактор разведения.

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

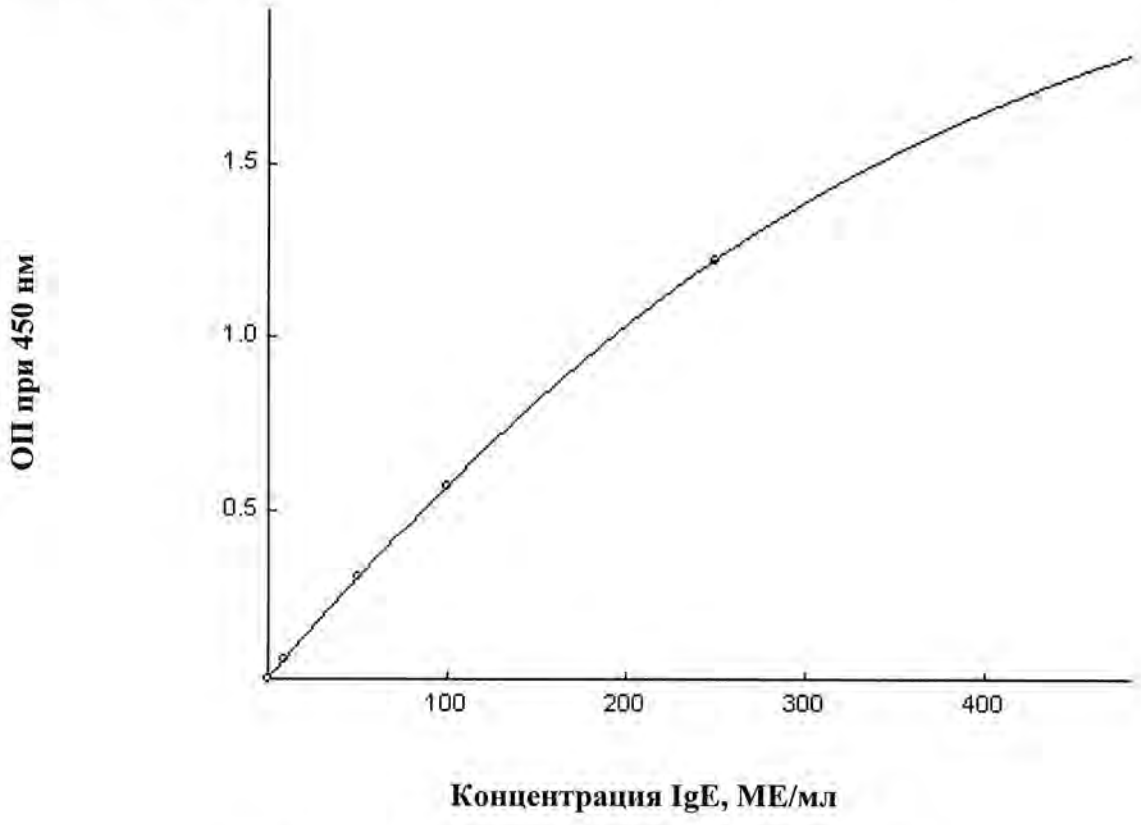


Рисунок 2. Типичный калибровочный график

9.5 Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации IgE, превышающих значение концентрации калибровочной пробы C_5, не допускается. Для точного определения

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

значения концентрации в таких образцах необходимо выполнить их разведение в соответствии с п 6.7.

10 Аналитические характеристики набора

10.1 Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных анти-IgE-антител с IgG, IgM, IgA.

10.2 Коэффициент вариации результатов определения IgE в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора «ИФА-общий IgE» не превышает 8 %.

10.3 Линейность. Зависимость концентрации IgE в образцах сыворотки крови при разведении их РР-С имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб C_1-C_5, МЕ/мл и составляет ± 10%.

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

10.4 Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» IgE – отношение измеренной к расчетной концентрации IgE в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы C_2. Процент открытия составляет (90–110) %.

10.5 Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация IgE в сыворотке крови человека не превышает 2,3 МЕ/мл.

10.6 Хук-эффект высоких концентраций. В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины ОП от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора «ИФА-общий IgE» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации IgE 10 000 МЕ/мл.

10.7 Диапазон ожидаемых значений. Содержание общего IgE измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 ч, у 79 здоровых лиц и 226 больных, страдающих различными аллергическими заболеваниями, в возрасте 21–45 лет. У 48 % здоровых лиц концентрация общего IgE была ниже 25 МЕ/мл, у 34 % – от 25 до 100 МЕ/мл, у 18 % – более 100 МЕ/мл. У 8 % больных, страдающих аллергическими заболеваниями, концентрация общего IgE была ниже 25 МЕ/мл, у 22 % – от 25 до 100 МЕ/мл, у 70 % – более 100 МЕ/мл.

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.

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

11 Форма выпуска набора

11.1 Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

1 **комплект 1** – проведение анализа ручным способом. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на **4 постановки** ИФА: 1 постановка – 3 стрипа (24 лунки). Всего – **96 определений**;

2 комплект 2 – для проведения анализа на автоматическом анализаторе открытого типа. Набор рассчитан на проведение анализа в монопликатах 88 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для измерения значения ОП раствора ТМБ. Набор рассчитан на 6 постановок иммуноферментного анализа: 1 постановка – 2 стрипа (16 лунок). Всего – 96 определений.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

12 Условия хранения и применения набора

12.1 Хранение набора должно производиться в упаковке предприятия-изготовителя в чистом, защищенном от влаги и света помещении при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 5 суток.

Запрещается замораживать компоненты набора.

12.2 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12.3 Срок годности набора – **12 месяцев**.

Приложение А

Библиография

[1] Санитарные правила
СП 17-129 РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности и гельминтами», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 27.07.2000 г. № 40

[2] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г. № 351
О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД

[3] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г. № 165
О проведении дезинфекции и стерилизации учреждениями здравоохранения

[4] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.04.2010 г. № 47
Об утверждении Инструкции о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих и признании утратившими силу некоторых постановлений Министерства здравоохранения Республики Беларусь

[5] Санитарные нормы и правила
СанПиН № 2.1.7.14-20-2005 «Правила обращения с медицинскими отходами»

Инструкция составлена
сотрудниками СП ООО «Фармлэнд»:

Начальником отдела
изделий медицинского назначения Ю.В.Сенчук

Ведущим-технологом Е.И.Лаврецкой

Ведущим специалистом
отдела изделий медицинского назначения И.М.Богдановской

и сотрудниками НИИ ФХП БГУ

Заведующий лабораторией
биохимии лекарственных препаратов В.М.Шкуматов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru