УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от_____2010 г.
№_____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор ООО «ХЕМА»
Ю. С. Лебедин
11 января 2010 г.

# ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в сыворотке (плазме) крови

«Общий IgE-ИФА»

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «Общий IgE-ИФА» предназначен для количественного определения общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Общий иммуноглобулин Е (IgE) считается лабораторным маркером атопических заболеваний (атопической астмы, дерматита и риноконъюктевита). Атопический (IgEзависимый) механиз может так же лежать в основе гастроэнтероколита, крапивницы, других форм васкулитов(в том числе системных), холицистита, вульвовагинита и цистита. Часть лекарственной аллергии (преимущественно на пенициллины и белковые препараты) также развивается по IgE,-зависимому механизму. При всех вышеперечисленных состояниях выработка высоких титров специфических антител класса IgE может приводить к повышению уровня общего IgE в сыворотке. Особенно высокий уровень общего IgE характерен для атопического дерматита. Кроме атопических заболеваний, общий IgE в сыворотке крови значительно повышается при паразитарных инвазиях и микозах (особенно системных), редко — при системных аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитных состояниях (особенно при гипер — IgE синдроме), а также при мастоцитозе (опухоли из тучных клеток) и чрезвычайно редкой IgE-миеломе. Снижение уровня общего IgE в сыворотке (ниже 15 МЕ/мл у взрослых) явление редкое и малоизученное, описано при гипогаммаглобулинемиях, некоторых аутоиммунных заболеваниях, язвенном колите и первичном билиарном циррозе.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Определение общего IgE в биологических жидкостях {наиболее распространено определение общего IgE в сыворотке (плазме) крови} в клинической практике используется обычно для следующих целей:диагностика атопических заболеваний;диагностика паразитарных инвазий и микозов;

1.4. Область применения — клиническая лабораторная диагностика.

КОПИЯ ВЕРНА

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

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение общего иммуноглобулина класса Е (IgE) основано на использовании «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к общему IgE человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание общего IgE, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата кроличьих поликлональных антител к IgE человека с пероксидазой хрена.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание содержимого лунок. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в исследуемом образце. Концентрацию общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности (011450) от содержания общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный с иммобилизированными на внутренней поверхности лунок мышиными моноклональными антителами; готов к использованию - 1 шт.;

калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (pH7,2-7.4), содержащие известные количества общего иммуноглобулина класса Е (IgE) О; 50; 200; 500; 1000 МЕ/мл, концентрации общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок(флаконов); готовы к использованию - 5 пробирок или флаконов (по 0,8 мл каждая);

конъюгат; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

ИФА-Буфер; готов к использованию - 1 флакон (14мл);

раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ); готов к использованию - 1 флакон (141 мл);

контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего иммуноглобулина класса Е (IgE); готова к использованию - 1 пробирка или флакон (0,8 мл);

концентрат отмывочного раствора 26х-кратный - 1 флакон (22 мл);

стоп-реагент; готов к использованию - 1 флакон (14 мл);

липкая лента с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;

Инструкция по применению Набора реагентов «Общий IgE-ИФА» - 1 шт;

Паспорт контроля качества Набора реагентов «Общий IgE-ИФА»- 1 шт.

КОПИЯ ВЕРНА

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

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Перекрестная реакция мышиных моноклональных антител к IgE с другими аналитами приведена в таблице:

| Аналит | Перекрестнаяреакция,% |
|---|---|
| IgG | <0.1 |
| IgM | <0.1 |
| IgA | <0.1 |

3.2. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором «Общий IgE-ИФА» концентрация общего IgE в сыворотке (плазме) крови не превышает 3,0 МЕ/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания общего IgE в исследуемых образцах сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора реагентов «Общий IgE-ИФА» не превышает 8,0 %.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» соответствие измеренной концентрации общего IgE предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 200 МЕ/мл

Процент «открытия» составляет 90-110 %.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации общего IgE в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей общий IgE, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 50 - 1000 МЕ/мл и составляет - 10,0 %.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

| Исследуемая группа | Единицы | | Единицы доп. | |
|---|---|---|---|---|
| | МЕ/мл | | МЕ/мл | |
| | Нижний предел | Нижний предел | Верхний предел | Нижний предел |
| до 6 месяцев | | 12 | | 25,8 |
| 6-12 месяцев | | 30 | | 64,2 |
| 1-3 года | | 45 | | 96,8 |
| 4-6 лет | | 70 | | 150,5 |
| 7-9 лет | | 90 | | 193,5 |
| 10-15 лет | | 120 | | 258 |
| <15 лет | | 130 | | 279,5 |

В соответствии с требованиями GLP (GoodLaboratoryPractice, Хорошая ЛабораторнаяПрактика) рекомендуется в каждой клинико-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов «Общий IgE-ИФА» уточнить значения концентрации общего IgE, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора - класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

КОПИЯ ВЕРНА

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

4.2. Меры предосторожности- 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, 1981 г.).

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 25-250 мкл;
- термостат, поддерживающий температуру +37+0,1 °с;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °с) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 24 ч или при температуре минус 20 °с не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят кроличьи антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов «Общий IgE-ИФА» для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации общего IgE в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

КОПИЯ ВЕРНА

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

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательноперемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре(+18-25 °с) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °с не более 10 сут.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Внесите во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.

7.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение образцов в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при температуре $37^0$С .

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 3 раза путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора. Перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.5. Внести во все лунки планшета по 100 мклконъюгата.

Внесение конъюгата в лунки планшета необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.6. Заклеить планшет липкой лентой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при температуре 37 °с .

7.7. По окончании инкубации удалите содержимое лунок и омойте лунки 5 раз.

7.8. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °с) в течение 1020 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.9. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

КОПИЯ ВЕРНА

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

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация общего IgE в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП45()). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.

9.2. Определить по калибровочному графику содержание общего IgE в исследуемых образцах. Если используемый образец предразводили, умножьте полученный результат на фактор разведения.

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «Общий IgE-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 С в течение всего срока годности (18 мес.).

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °с не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 неизвестных образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат и стоп-реагент после вскрытия флакона допускается хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок (флаконов) допускается хранить при температуре +2-8 °с не более 2 мес.; при необходимости более длительного хранения - при температуре минус 20 С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °с) не более 5 сут. или при температуре +2-8 °с не более 30 сут.;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2-8 °с в течение всего срока годности Набора;

КОПИЯ ВЕРНА

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

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

**По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «Общий IgE-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040**

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
11 января 2010 г. М.П. ХЕМА

«СОГЛАСОВАНО»
Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГОУ ДПО РМАПО Росздрава _____ д.м.н., профессор В. В. Долгов

М.П.

Подпись [illegible]
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись

КОПИЯ ВЕРНА

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