

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля  
лекарственных средств,  
изделий медицинского назначения  
и медицинской техники МЗ РФ

\_\_\_\_\_ В.Е. Акимочкин

«24» декабря 2003 г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ  
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ  
(ИФА-общий IgE)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа  
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 22 сентября 2003 г.)

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов ИФА-общий IgE предназначен для количественного определения содержания общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Иммуноглобулин Е (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.

**1.3.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно (всего 96 определений).

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

## 2. 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 общего 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 общего IgE в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству связанного конъюгата анти-IgE-пероксидаза. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация общего IgE в исследуемых образцах.

### 3. СОСТАВ НАБОРА:

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к общему IgE, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к общему IgE» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному референсному препарату WHO 75/502 на общий IgE, содержащие известные количества общего IgE: 0; 10; 50; 100; 250; 500 МЕ/мл; **концентрации общего IgE в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов** — 6 флаконов (лиофилизированные препараты или жидкости по 0,5 мл);
- конъюгат анти-IgE-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (18 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» — 1 флакон (14 мл);
- буфер для разведения образцов сыворотки крови, маркирован «Буфер Д» — 1 флакон (3,0 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп реагент (1 Н соляная кислота), маркирован «Стоп-реагент» — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего IgE, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (лиофилизированный препарат или жидкость 0,5 мл);
- пакет полиэтиленовый закрывающийся (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена).

## **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

**4.1. Специфичность.** Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к IgE с IgG, IgM, IgA.

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

**4.3. Линейность.** Зависимость концентрации общего IgE в образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10–500 МЕ/мл и составляет  $\pm 10\%$ .

**4.4. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» общего IgE — соответствие измеренной концентрации общего IgE предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 50 МЕ/мл. Процент открытия составляет 90–110%.

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

**4.6.** 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.

**4.7. Хук-эффект высоких концентраций.** В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ИФА-общий IgE хук-эффект не обнаружен вплоть до

концентрации общего IgE 10 000 МЕ/мл.

**4.8.** Клиническая проверка. Содержание общего IgE измеряли в сыворотке крови, взятой с 9 до 11 часов, 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.

**4.9.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций общего IgE, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** При работе с набором следует соблюдать «Правила 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.).

**5.4.** Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть

пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. в состав набора входят образцы и производные крови человека, которые являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

**5.7.** Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание с амплитудой колебаний 3-4 мм и частотой 8-13 Гц (500–800 об/мин) при температуре +37°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со

сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 300 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

### **7.1. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка.**

- Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

- Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 0,5 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре (+18...25°C) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

Хранить при температуре +2...8°C не более 1 месяца.

### **7.2. Буфер Д готов к использованию.**

### **7.3. Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови.** Если значения концентрации общего IgE в исследуемых образцах по предварительным данным выше 500 МЕ/мл, образцы следует развести

буфером Д в 20 раз:

190 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

**7.4.** Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5.** Конъюгат анти-IgE-пероксидаза готов к использованию.

**7.6.** Промывочный буфер. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.7.** Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию.

**7.8.** Стоп-реагент готов к использованию.

## 8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На странице 15 приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – №1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – №2 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 0 МЕ/мл;

C1, C2 – №3 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 10 МЕ/мл;

D1, D2 – №4 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 50 МЕ/мл;

E1, E2 – №5 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 100 МЕ/мл;

F1, F2 – №6 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 250 МЕ/мл;

G1, G2 – №7 для измерения величины оптической плотности калибровочной пробы 500 МЕ/мл;

H1, H2 – №8 для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

**8.3.** Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 150 мкл конъюгата анти-IgE-пероксидаза.

**8.4.** Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сы-

*вороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

**8.5.** Инкубировать стрипы в течение 1,5 часов при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°С со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунки декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 7.6, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°С) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минут.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм.

Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений

оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину  $B$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой  $B - B_T$ , где  $B_T$  — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках А1 и А2.

В линейных координатах построить калибровочный график зависимости  $B$  (ед. опт. плотн.) от концентрации общего IgE в калибровочных пробах (МЕ/мл).

Определить содержание общего IgE в пробах по калибровочному графику. В случае дополнительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию IgE умножить на фактор разведения.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при комнатной температуре (+18...25°C).

## 9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**9.1.** Набор ИФА-общий IgE должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить в пакет с этикеткой (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена), который затем вложить в прозрачный пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- конъюгат Е, буфер Д и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

**9.2.** Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения (до 3 месяцев) — при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

**9.3.** Для проведения анализа не следует использовать плазму крови, гемолизированную и мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

**9.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации общего IgE в контрольной сыворотке.

**9.5.** Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

**9.6.** Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера.

**9.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
Конъюгат анти-IgE-пероксидаза, мкл	–	150	150	150	150	150	150	150	150
КП 0 МЕ/мл, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП 10 МЕ/мл, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП 50 МЕ/мл, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП 100 МЕ/мл, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП 250 МЕ/мл, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП 500 МЕ/мл, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Инкубация №1	1,5 часа, термостатируемый шейкер, +37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300	5х 300
Раствор ТМБ, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация №2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП растворов в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

**Примечания:** КП – калибровочная проба;  
 КС – контрольная сыворотка;  
 С<sub>х</sub> – анализируемые пробы;  
 ОП – оптическая плотность;  
 КТ – комнатная температура (+18...25°C).

**По вопросам качества набора ИФА-общий IgE следует обращаться по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИСКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (499) 120-60-95, 120-60-96.**