

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е

## EIA-1788, IgE (Immunoglobulin E)

Каталог. № : EIA-1788  
Количество : 96  
Производитель: DRG (США)

Методика от 03-10-2012  
Версия 6.0



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### 1 НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения концентрации иммуноглобулина Е (IgE) в человеческой сыворотке. Используется для оценки сверхчувствительных и аллергических реакций пациентов.

### 2 ВВЕДЕНИЕ

Пациенты с аллергическими заболеваниями, такими как аллергическая астма, аллергический дерматит и сенная лихорадка, показывают взаимосвязь с увеличением уровня общего иммуноглобулина в крови. IgE также известен как антитело, способное к реакциям. Вообще, рост уровня IgE указывает на увеличение непрямого гиперчувствительности к IgE, что ответственно за аллергические реакции. Высокий уровень IgE также проявляется при паразитических инвазиях, таких как анкилостома и заболевание центральной системы. Снижение уровня IgE происходит при аутоиммунных заболеваниях, язвенных колитах, гепатитах, раке и малярии. Уровень IgE в крови пуповины или сыворотке может прогнозировать риск возможных аллергических заболеваний в будущем у ребенка.

Концентрация уровня IgE в пациентов зависит от степени аллергической реакции и от числа разных аллергенов к которым он синтезируется. Неаллергический уровень концентрации IgE у разных индивидов имеет широкие границы и растет в детстве, достигая своего высшего уровня в 15-20 лет, потом остается неизменным до 60 лет, после чего медленно падает.

### 3 ПРИНЦИП МЕТОДА

IgE ELISA есть твердо-фазовый ферментно-связанный иммуносорбентный анализ, основанный на принципе "сэндвича". Анализируемые образцы (сыворотка) добавляются к моноклональным IgE-антителам, иммобилизованным на полистирольных лунках для солидной фазы и инкубируется с нулевым буфером. Если человеческий IgE присутствует в образце, он реагирует с антителом на лунке. Потом лунки промываются, чтоб удалить остатки образцов, и добавляется козлиное анти-IgE антитело, конъюгированное пероксидазой хрена. Конъюгат связывается с IgE на лунке, в результате чего молекулы IgE будут в сэндвиче между солидно-фазными и ферментно-связанными антителами. После инкубации при комнатной температуре ячейки промываются для удаления несвязанного конъюгата. Добавляется ТМВ реагент и инкубируется при комнатной температуре 20 минут, в результате развивается голубой цвет. Развитие цвета останавливается добавлением стоп раствора, цвет изменяется на желтый и измеряется спектрофотометрически при 450 нм. Концентрация IgE прямо пропорциональна интенсивности цвета в образце.

ИФА-набор DRG предоставляет быстрый, чувствительный и надежный анализ общего IgE. Используются два тщательно отобранных IgE-антитела для определения минимальной концентрации IgE – 5,0 МЕ/мл.

### 4 ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

1. **Планшет** с привитыми моноклональными мышиными анти-IgE на 96 лунок, 1 шт.
2. **IgE Нулевой буфер**, 13 мл.  
Содержит Трис буфер с желтым красителем и консервантом.
3. **Реагент Ферментного конъюгата**, 18 мл  
Содержит бычью сыворотку с желтым красителем и консервантом.
4. **Набор стандартов**: 0,5 мл/флакон. Содержат 0, 10, 50, 100, 400 и 800 МЕд/мл иммуноглобулина Е в бычьей сыворотке с консервантом. Жидкие, готовы к использованию.

5. **ТМВ субстрат**, 1 бутылка, 11 мл. Содержит 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидина (ТМБ), стабилизированного в буферном растворе.
6. **Стоп раствор** (1N HCl), 1 бутылка, 11 мл. Содержит разбавленную хлористоводородную кислоту.

### 5 НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Точные пипетки 0.02, 0.1, 0.15, 0.2 и 1 мл.
- Одноразовые наконечники к пипеткам
- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм
- Вортекс или его эквивалент.
- Абсорбирующая бумага
- Графическая бумага
- Материал контроля качества (напр., контрольная сыворотка BioRad Lymphochek)

### 6 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Внимание: данный набор содержит материал человеческого происхождения. Исходный материал, используемый для изготовления набора, был протестирован утвержденными методами FDA и дал отрицательный результат на HBsAg, ВИЧ 1 и 2 и HCV. Однако, ни один метод не может полностью гарантировать отсутствие этих возбудителей. Поэтому все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально инфекционными. Использование и утилизация данных материалов должны проводиться в соответствии с национальными методическими указаниями относительно безопасности использования биологически опасных веществ.
2. Не используйте реагенты после истечения срока годности; не меняйте компоненты набора, не используйте компоненты наборов разных партий.
3. Не используйте реагент, если он помутнел, или у Вас есть подозрение его заражения.
4. Не используйте реагент, если флакон поврежден.
5. Сразу же закручивайте колпачки флаконов. Не меняйте колпачки.
6. Каждая лунка может использоваться только один раз.
7. Не распределяйте реагенты ртом.
8. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как аزيد натрия, не должны использоваться в ферментной реакции.
9. Избегайте контакта с 1NYCl. Он может вызвать раздражение кожи и ожоги. В случае контакта промойте большим количеством воды и обратитесь к доктору, если раздражение не проходит.
10. Только для диагностического использования in-Vitro.

### 7 ХРАНЕНИЕ НАБОРА

1. После получения неоткрытые наборы хранить при 2-8 °C до истечения срока годности, указанного на этикетке набора.
2. Открытые используемые реагенты стабильны до истечения срока годности в условиях правильного хранения при температуре 2-8 °C.
3. Храните микропланшет в запечатанной упаковке с дессикантом, чтобы минимизировать подвержение его внешнему воздействию и попадание влаги.

### 8 СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Сыворотка должна быть приготовлена из цельной крови, собранной обычной технологией. Этот набор предназначен для использования сыворотки без добавок. Избегайте высокогемолитических (ярко-красных), липемических (белесоватых) и мутных образцов.
2. Образцы нужно закрывать колпачком и можно хранить до 48 часов при температуре 2-8 °C. Образцы, хранящиеся на протяжении более длительного времени, нужно замораживать до температуры -20 °C, но только 1 раз. Перед проведением анализа размороженные образцы следует несколько раз перевернуть.

### 9 ИНСТРУМЕНТАРИЙ

Для измерения абсорбции можно использовать микротитровальный луночный считыватель с диапазоном частот 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности от 0 до 2 ОП или больше при длине волны 450 нм

### 10 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты нужно привести к комнатной температуре (18-25 °C) перед использованием.
2. Все реагенты следует смешать, слегка взбалтывая флакон перед использованием. Не допускайте образования пены.

3. Образцы с ожидаемыми значениями более 800 МЕд/мл перед проведением анализа необходимо разбавить нулевым стандартом. Рекомендуемое исходное разбавление – 1:100.

#### 11 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Поставьте необходимое число покрытых лунок в держатель.
2. Добавьте **20 мкл стандартов, контролей и образцов** в лунки.
3. Добавьте **100 мкл Нулевого буфера** в каждую лунку.
4. Тщательно мешайте 10 сек. Очень важно добиться полного смешивания на этом этапе.
5. Инкубируйте при комнатной температуре (18-25 °С) 30 минут.
6. Опустошите лунки, вытряхнув содержимое в контейнер для отходов.
7. Промойте и опустошите **планшет 5 раз дистиллированной или деионизированной водой** (не используйте воду из-под крана).
8. Резко переверните планшетку на абсорбирующую бумагу для удаления оставшихся капель воды.
9. Добавьте **150 мкл Ферментного конъюгата** в каждую лунку. Перемешайте 10 секунд.
10. Инкубируйте при комнатной температуре 30 минут.
11. Опустошите лунки.
12. Промойте планшетку 5 раз дистиллированной или деионизированной водой (не используйте воду из-под крана).
13. Переверните планшет на абсорбирующую бумагу для удаления оставшихся капель воды.
14. Добавьте **100 мкл ТМВ субстрата** в каждую лунку. Перемешайте 5 секунд.
15. Инкубируйте при комнатной температуре в темноте 20 мин.
16. Добавьте **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку.
17. Тщательно перемешайте 30 сек. Важно добиться, чтоб голубой цвет изменился на желтый целиком.
18. Считайте оптическую плотность при 450 нм планшетным ридером **в течение 15 минут**.

#### 12 ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите среднее значение абсорбции (A450) для каждого набора установленных стандартов, контроля и образцов.
2. Постройте стандартную кривую, откладывая среднюю абсорбцию, полученную для каждого стандарта на оси Y против его концентрации в МЕд/мл на оси X на графической бумаге.
3. Используя среднюю абсорбцию для каждого образца, определите соответствующую концентрацию IgE в МЕд/мл на стандартной кривой. В зависимости от опыта и наличия необходимой техники, можно применять другие методы обработки данных.
4. Разбавление образца – если образец содержит более 800 МЕд/мл IgE, разбавьте его 1:100 или больше нулевым стандартом. После анализа разбавленного образца, умножьте полученное значение на соответственный фактор разбавления.
5. Величину всех разбавленных образцов нужно потом перевести с помощью фактора разбавления.

#### 13 СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Референтные стандарты стандартизированы по эталону 2 IRP, 75/502 (1981) Всемирной организации Здравоохранения.

#### 14 ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

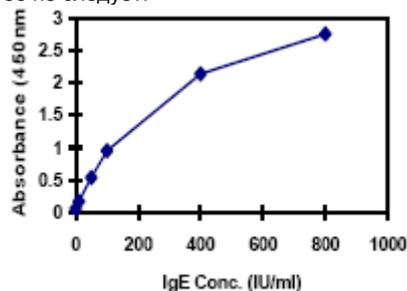
1. Ручное раскапывание:  
Для каждого анализа рекомендуется использовать не более 32 лунок. Раскапывание всех стандартов, образцов и контролей необходимо завершить в пределах 3 минут.
2. Автоматическое раскапывание:  
В каждом анализе можно использовать полный планшет с 96 лунками. Однако рекомендуется завершить раскапывание всех стандартов, образцов и контролей в пределах 3 минут.
3. Тестирование всех стандартов, образцов и контролей нужно проводить параллельно в двойном экземпляре с одинаковыми условиями анализа.
4. Рекомендуется считать лунки в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

#### 15 ПРИМЕР ТИПИЧНОЙ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного анализа со считыванием ОП при 450 нм. Следующие данные предназначены только для демонстрации и не должны использоваться во время тестирования. В каждом эксперименте пользователь должен построить собственную стандартную кривую с полученных данных пациента.

IgE (МЕд/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,058
10	0,167
50	0,538
100	0,950
400	2,135
800	2,748

Данная стандартная кривая охватывает динамический диапазон IgE от 5 до 800 МЕд/мл. Она служит исключительно для иллюстрации, использовать ее не следует.



#### 16 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень общего IgE в сыворотке здорового взрослого человека без аллергии становится меньше чем 150 МЕд/мл. Отклонения в концентрации общего IgE может наблюдаться у некоторых возрастных групп и людей с определенными клиническими состояниями, как коротко изложено во "Введении".

На основе населения пациентов и географической зоны каждая лаборатория устанавливает собственные диапазоны нормы. Эти значения клинически значимы только после проведения достаточного количества анализов на протяжении соответствующего периода времени.

Имеющаяся литература дает следующую информацию относительно общего иммуноглобулина E в человеческой сыворотке:

Нормальное геометрическое среднее значение: 39 МЕд/мл IgE

Нормальные диапазоны: возраст (лет)	IgE (МЕд/мл)
0 – 3	< 10
3 – 4	< 25
4 – 7	< 50
4 – 14	< 100
15 +	< 150

#### 17 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

##### А. Достоверность

Статистическое исследование, проведенное среди 98 образцов здоровых пациентов с диапазоном концентрации IgE от 6,4 МЕ/мл до 1039,2 МЕ/мл, продемонстрировало хорошую корреляцию с имеющимся на рынке набором (Hybritech Tandem TM-E IgE), приведенную ниже:

N = 98

Коэффициент корреляции = 0.96

Уклон: 1.041

Точка пересечения: -23.77

Среднее значение DRG: 209.4 МЕд/мл

Среднее значение Bio-Rad: 210.1 МЕд/мл

##### В. Чувствительность

Минимальная концентрация, определяемая данным набором, измеренная 2SD от среднего значения нулевого стандарта, составляет, по крайней мере, 5,0 МЕд/мл.

##### С. Точность

###### а. Точность в пределах анализа

Точность в пределах анализа определялась повторным определением трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Изменчивость в пределах анализа показана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3
Количество повторов	24	24	24
Среднее IgE (МЕд/мл)	339.5	171.8	105.1
Стандартное отклонение	18.6	11.5	4.8
Коэффициент изменчивости %	5.5%	6.7%	4.6%

###### б. Точность между анализами

Точность между анализами определялась повторным измерением трех разных образцов сыворотки в нескольких индивидуально калиброванных анализах. Изменчивость между анализами показана ниже:

Образец сыворотки	1	2	3
Количество повторов	24	24	24
Среднее IgE (МЕд/мл)	384.4	172.4	91.9
Стандартное отклонение	20.8	12.5	4.9
Коэффициент изменчивости %	5.4%	7.3%	5.3%

#### D. «Хук»-Эффект

В данном анализе «хук»-эффект не наблюдался, так как процедура анализа является последовательной.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

#### E. Восстановление и линейность

##### а. Восстановление

Смешали и проанализировали в двойном экземпляре разные сыворотки пациентов с известными уровнями IgE. Среднее выявление составляет 98.0%.

Ожидаемая концентрация (МЕд/мл)	Наблюдаемая концентрация (МЕд/мл)	% Восстановления
489,3	481,9	98,5
301,5	309,1	102,5
208,5	181,8	87,2
86,3	82,2	95,3
49,3	48,0	97,3
27,8	27,4	98,4
14,7	14,3	97,6
542,5	533,2	98,3
313,7	296,4	94,5
132,6	129,9	97,9
68,7	68,9	100,3
22,5	21,4	95,1

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

##### б. Линейность

Три образца пациентов были последовательно разбавлены для определения линейности. Среднее выявление составляет 103.7%.

Таблицу линейности см. в оригинале инструкции.

#### F. Специфичность

Для определения перекрестной реакции проанализировали следующие три человеческих иммуноглобулина:

Анализируемый иммуноглобулин	Концентрация	Интенсивность выработанного цвета, равная IgE в сыворотке (МЕд/мл)
Человеческий Иммуноглобулин А	400 мг/дл	< 5 МЕд/мл
Человеческий Иммуноглобулин G	400 мг/дл	< 5 МЕд/мл
Человеческий Иммуноглобулин М	400 мг/дл	< 5 МЕд/мл

#### 18 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Стандартные правила лабораторной практики требуют, чтобы контроль использовался при каждой калибровочной кривой. Статистически значительное количество контролей должно быть измерено, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны, гарантирующие точную работу.

#### 19 ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Верные и воспроизводимые результаты можно получить, когда процедура теста проводится с полным пониманием сути инструкции и при хорошей лабораторной практике.
2. Результаты, полученные вследствие этого анализа должны использоваться только в качестве дополнения к другим диагностическим исследованиям и как информация для врача. Не следует исключать наличие аллергии, опосредованной IgE, если результаты анализа низкие или в пределах нормы, или же считать IgE единственным источником заболевания в случае завышенного уровня IgE. Есть пациенты с завышенным уровнем IgE в сыворотке, которые не страдают аллергическим симптомами, а также пациенты с аллергией и нормальным уровнем IgE в сыворотке.
3. Слегка липемические или гемолизированные образцы не должны препятствовать анализу. Наличие осадка в образце или реагентах может свидетельствовать о контаминации, такие образцы использовать не стоит.
4. Очень важной является процедура промывания. Недостаточное промывание дает неточные результаты и ложно завышенную абсорбцию.