



НАБОРА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА E
В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ
IgE Totali IEMA WELL

Кат. № : KP21IW
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика 06-2006
Версия 9

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (См. В оригинале инструкции)

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Этот тест основан на иммуноферментном анализе (ИФА). Используются два различных anti-IgE антитела, одно, адсорбировано на лунках, и другое конъюгированное к пероксидазе хрена (HRPO). В течение инкубации IgE, присутствующий в калибраторах и образцах связывается к обоим антителам сразу, формируя "sandwich". Следуя за этой инкубацией, свободный материал удаляется аспирацией и промывкой. Остаточная активность фермента, наблюдающаяся в лунках, будет прямо пропорциональна концентрации IgE в калибраторах и образцах и наблюдается при инкубации твердой фазы с раствором хромогена (Tetramethylbenzidine, TMB) в субстрате буфере. Колориметрическое считывание будет проводится при использовании спектрофотометра при 450 нм и при 405 нм.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для проведения 96 тестов
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.

3.1 Специфические реагенты

1. **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок, покрытых мышинным моноклональным anti-IgE антителом. Неиспользованные лунки необходимо хранить при 2-8°C в поставляемом полиэтиленовом пакете и тщательно запечатанным.
2. **Калибраторы:** 7 фл. IgE в основе сыворотки, лиофилизованные. Концентрации: 0, 1, 5, 25, 100, 300 и 1000 МЕ/мл. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить нулевой калибратор 2 мл дистиллированной воды и калибраторы 1-6 1 мл дистиллированной воды. После воссоздания хранить при 2-8°C 2 недели, для более длительного хранения заморозить до -20°C.
3. **Ферментный конъюгат (концентрированный),** 1 фл. (2,7 мл) поликлонального anti-IgE антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRPO) в Tris HCl, BSA и стабилизаторах. Консервант: неомицин. Перед использованием добавить 1.2 мл ферментного конъюгата к флакону с разбавителем конъюгата (12 мл) или разбавьте конъюгат 1:11 разбавителем конъюгата, исходя из необходимого объема для проведения анализа, и тщательно перемешать. Хранить разбавленный конъюгат при 2-8°C в течении 2 месяцев.
4. **Разбавитель конъюгата:** 2 фл. (12 мл) Tris-HCl и BSA. Готов к использованию. Консервант: неомицин.
5. **Контрольная сыворотка:** 1 фл. IgE в основе сыворотки. Лиофилизованная. Консервант: тимеросал (<0.05%). Воссоздать с 1 мл дистиллированной воды. После воссоздания хранить при 2-8°C 2 недели; для более длительного хранения заморозить до -20°C.

3.2 Общие реагенты для всех наборов серии гормональных

1. **Промывочный раствор (концентрированный):** 1 фл. (50 мл) PBS и Tween 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Разбавить содержимое флакона до 500 мл дистиллированной водой. У случае нерастворившихся кристаллов, обработайте раствор, поместив флакон на несколько минут в инкубатор при 37°C. Хранить разбавленный промывочный раствор при 2-8°C в течении 30 дней.
2. **Хромоген:** 1 фл. (15 мл) TMB (Tetramethylbenzidine) из цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Готов к использованию.
3. **Буфер субстрата:** 1 фл. (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Готов к использованию.

ПРИМЕЧАНИЕ: для того чтобы получить раствор субстрата смешайте равные количества хромогена из буфером субстрата, используя темный, тщательно очищенный флакон. Избегайте прямого попадания света и используйте в течении 1 часа со времени приготовления.

4. **Блокирующий реагент:** 1 фл. (14 мл) N H₂SO₄. Готов к использованию.

— Адгезивная пленка для планшета

— Полиэтиленовый пакет

4. МАТЕРИАЛЫ, КОТОРЫЕ ТРЕБУЮТСЯ НО НЕ ПОСТАВЛЯЮТСЯ

4.1 Ручная процедура

1. Регулируемые, автоматические микропипетки со сменными насадками.
2. Градуированная колба.
3. Микропланшетный встряхиватель на 1200 об/мин..
4. Помпа для аспирации или автоматизированное устройство для промывки лунок.
5. Микропланшетный спектрофотометр с интервалом абсорбцией в пределах 0-3,0 А при длине волны 450 и 405 нм.
6. Миллиметровая графическая бумага.
7. Дистиллированная вода.
8. Разбавитель образца.

4.2 Автоматизированная процедура

- данный анализ может быть проведен с использованием автоматизированного аппарата для ELISA наборов на микропланшетах.
- Производитель гарантирует использование данного набора в автоматизированных аппаратах компаний RADIM и/або SEAC.
- При использовании других автоматизированных микропланшетных аппаратов, ответственность за правильность анализов ELISA наборов несет пользователь.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ и ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Для того, чтобы получить правильные и соответствующие результаты, следуйте правилам:

1. Не смешивайте реагенты разных партий.
2. Не используйте реагенты по окончании срока пригодности.
3. используйте тщательным образом очищенную лабораторную посуду, свободную от загрязнения ионами металлов или окисляющих веществ.
4. Используйте дистиллированную воду, которая сохраняется в тщательным образом очищенных емкостях.
5. Избегайте загрязнения проб. С этой целью для каждой образца и реагента используйте сменные насадки.

6. Выполняйте четко требования относительно инкубации как описано в разделе «Процедура анализа».
- Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:**
7. Одевайте перчатки при работе с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может дать ошибочные результаты.
8. Не пипетуйте ртом.
9. Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
10. Методов, которые бы с окончательной уверенностью убедили, что такие инфекционные агенты как вирус гепатита В, ВОЛ-вирус или другие в компонентах набора отсутствуют, не существует. Поэтому, образцы и материалы нужно считать потенциально инфекционными и использовать с соответствующей осторожностью.
11. Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.

6. ЗАБОР И ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Анализ можно проводить с образцами сыворотки. Высоко липемические или гемолизированные образцы должны быть удалены. Хранить образцы при 2-8°C в течении 7 дней. Для более длительного хранения рекомендуется заморозить до -20°C. Перед проведением анализа удостоверьтесь, что все образцы хорошо очищены. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцы с предполагаемыми концентрациями IgE более 1000 МЕ/мл необходимо разбавить нулевым калибратором (Процедура А). Для процедуры С образцы должны быть разбавлены 1:5 разбавителем образца, код KP21IWDC, который поставляется по требованию (напр.: 10 мкл сыворотки + 40 мкл разбавителя).

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА*

- Приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре.
- Перед использованием перемешайте образцы переворачиванием.

Примечание: данный тест использует три разные методики, отличающихся за чувствительностью, временем инкубации, калибраторами и разбавлением образцов.

Процедура А (нижний уровень чувствительности):	Калибраторы 0, 5, 25, 100, 300 и 1000 МЕ/мл Инкубация 30 минут. Неразбавленные образцы
Процедура В (высший уровень чувствительности):	Калибраторы 0, 1, 5, 25, 100 и 300 МЕ/мл Инкубация 60 минут. Неразбавленные образцы
Процедура С	Калибраторы 0, 5, 25, 100, 300 и 1000 МЕ/мл Инкубация 30 минут. Разбавленные образцы 1:5.

1. Приготовьте лунки для: бланка, калибраторов, контрольной сыворотки и образцов.
2. Внесите **10 мкл** каждого калибратора, контрольной сыворотки и неразбавленного образца (**Процедура А и В**) или разбавленный образец 1:5 (**Процедура С**) в соответствующие лунки.
3. Внесите в каждую лунку 200 мкл ферментного конъюгата, кроме лунки бланка.
4. Накройте микропланшет адгезивной пленкой и легко смешайте;
5. Инкубируйте лунки на протяжении 30 +/-2 минут (**Процедура А и С**) или в течении 60 +/-5 минут (**Процедура В**) при комнатной температуре (+18-25°C) на орбитальном встряхивателе (1200 об/мин.).
6. Снимите адгезивную пленку и тщательным образом аспирируйте инкубационную смесь из всех лунок.
7. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывного раствора. Спируйте всю жидкость из лунок.
8. Внесите **200 мкл** раствора субстрата-хромогена в каждую лунку (см. раздел Реагенты);
9. Инкубируйте **15 минут при комнатной температуре** на орбитальном встряхивателе (1200 об/хв.), избегайте попадания прямого солнечного света;
10. Внесите в каждую лунку **100 мкл** блокирующего реагента;
11. Считайте абсорбцию всех лунок желательно на бихроматическом спектрофотометре при **450 нм** с контрольной длиной волны 620 нм (настраивая аппарат на ноль с лункой бланка). В случае превышения значений абсорбции считайте при 405 нм. Считывание провести на протяжении **20 минут** после завершения анализа.

*При использовании в процедуре автоматизированных аппаратов компаний RADIM и/або SEAC, ссылайтесь на соответствующие инструкции.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (См. ст.. 32)

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для того, чтобы получить лучшую чувствительность данный метод использует спектрофотометрическое считывание при двух длинах волны (450 и 405 нм). Для проб с концентрациями IgE в диапазоне от 0 до 100 МЕ/мл, считываются при 450нм; для проб с количеством IgE выше 100 МЕ/мл, считываются при 405 нм.

Нарисуйте калибровочную кривую на миллиметровой графической бумаге, вывода концентрации калибраторов' (ось абсцисс) против абсорбции, полученной для каждого калибратора (ось ординат). Соответствующие концентрации IgE в МЕ/мл получаются путем интерполяции абсорбции каждой образца на калибровочной кривой; в случае разбавленных образцов перемножьте за фактором разбавления.

* Используя автоматический аппарат для микропланшетов RADIM и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание будет выполняться автоматически при 3 различных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом расширяя амплитуду кривой.

9.1 ПРИМЕР ВЫЧИСЛЕНИЯ

Указанные ниже значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных данных.

Процедура А:

Описание	Абсорбция 450 нм	IgE	Абсорбция 405 нм	IgE
Калибратор 0 МЕ/мл	0.018		0.006	
Калибратор 5 МЕ/мл	0.147		0.051	
Калибратор 25 МЕ/мл	0.520		0.179	
Калибратор 100 МЕ/мл	1.667		0.574	
Калибратор 300 МЕ/мл	>3.000		1.117	
Калибратор 1000 МЕ/мл	>3.000		1.623	
Образец 1	0.865	46 МЕ/мл	0.298	
Образец 2	> 3.000		1.252	490 МЕ/мл

Процедура А:

Описание	Абсорбция 450 нм	IgE	Абсорбция 405 нм	IgE
Калибратор 0 МЕ/мл	0.020		0.007	
Калибратор 1 МЕ/мл	0.070		0.024	
Калибратор 5 МЕ/мл	0.269		0.093	
Калибратор 25 МЕ/мл	1.084		0.373	
Калибратор 100 МЕ/мл	2.800		0.990	
Калибратор 300 МЕ/мл	>3.000		1.670	
Образец 1	0.313	6,5 МЕ/мл	0.108	
Образец 2	>3.000		1.206	165 МЕ/мл

Процедура С:

За примером вычисления аналитического сигнала стандартной кривой, просьба см. процедуру А. образцы должны быть умножены на 5 (фактор разбавления).

9.2 НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Значения указанные ниже являются ориентировочными. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный нормальный диапазон.

Ниже 20 МЕ/мл	Аллергия невозможна
Между 20 и 100 МЕ/мл	Аллергия под сомнением
Выше 100 МЕ/мл	Аллергия очень вероятна

9.3 КРИТЕРИИ ДОСТОВЕРНОСТИ

Перед началом проведения вычисления результатов убедитесь, что концентрация контрольной сыворотки находится в пределах указанных в листке Контроля качества.

10. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА**10.1 Специфичность**

Данный метод не показал перекрестной реактивности к иммуноглобулинам класса: IgA, IgM, IgG и IgD.

10.2 Чувствительность

Чувствительность была определена на основе калибровочной кривой и выражена как минимальная доза, указывая на значительную разницу с нулевым калибратором (средн. значение + 3 CO). Эта доза составляет **1 МЕ/мл (Процедура А и С)** и **0,4 МЕ/мл (Процедура В)**.

10.3 Точность

Точность была оценена исходя из вариативности в пределах процедуры та между процедурами в 3 сыворотках при разных концентрациях IgE.

Повторяемость (в пределах процедуры)

Процедура А					Процедура В				
Сыворотка	Средн.	± (МЕ/мл)	CO	КВ %	Средн.	± (МЕ/мл)	CO	КВ %	К-во репликатов
a	24.2	±	0.95	3.9	25.8	±	0.52	2.0	10
b	43.7	±	1.83	4.2	51.1	±	0.96	1.9	10
c	77.2	±	2.93	3.8	87.0	±	1.94	2.2	10

Воспроизводимость (между процедурами)

Процедура А					Процедура В				
Сыворотка	Средн.	± (МЕ/мл)	CO	КВ %	Средн.	± (МЕ/мл)	CO	КВ %	К-во анализов
a	21.9	±	2.96	13.5	25.4	±	2.33	9.2	10
b	42.9	±	3.71	8.6	49.0	±	2.65	5.4	10
c	80.4	±	6.36	7.9	83.4	±	2.65	3.2	10

10.4 Тщательность

Тщательность метода была проверена тестами на восстановление и параллелизм.

Тест на восстановление

Известные количества IgE были добавлены к нормальной сыворотке и проанализированы.

Добавлено (МЕ/мл)	Ожидаемый (МЕ/мл)	Получено (МЕ/мл)	Восстановление %
P	—	7.0	—
P + 200	207.0	206.5	99.7
P + 100	107.0	104.2	97.4
P + 50	57.0	53.0	93.0
P + 25	32.0	30.4	95.0
P + 12.5	19.5	19.1	97.9
P + 6.25	13.2	13.0	98.5

Тест на параллелизм

Сыворотка с высокой концентрацией IgE была протестирована при разных разведениях нулевым калибратором.

Разбавление	Ожидаемый (МЕ/мл)	Получено (МЕ/мл)
S неразбавленный	—	120.0
1:2	60.0	61.1
1:4	30.0	31.3
1:8	15.0	15.6
1:16	7.5	8.5
1:32	3.7	3.5
1:64	1.9	1.7

10.5 «Хук-эффект»

Каждый раз, когда образцы с очень высокими концентрациями антигена анализируются неразбавленными в поэтапном "сэндвич"- методе, как в этом наборе, «хук-эффект» может дать значение концентраций очевидно ниже, чем фактические значения. В этом наборе на наблюдается «фук-эффект» в концентрации до 10,000 МЕ/мл для обеих процедур.

11. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

Результаты анализа должны тщательным образом интерпретироваться и быть подтверждены клиническими оценками и другими диагностическими методиками.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com