

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИЙ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG
В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

Specific IgG ELISA

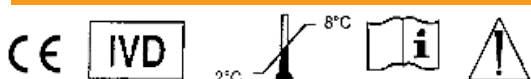
Enzyme Immuno Assay for the quantitative determination
of specific IgG antibodies
in human Serum or Plasma

С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛЕРГЕНОВ НАНЕСЕННЫХ В ЛУНКИ ЛОМКИХ СТРИПОВ
Тест на специфические IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа
(IgG-ELISA)

Номер по каталогу **REF 10100PG**  96 определений

Номер по каталогу **REF 12001PG**  6 постановок

Для *in vitro* диагностики
Регистрационное Удостоверение
№ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015г.



ВВЕДЕНИЕ

Антитела, также известные как иммуноглобулины (Ig), играют важную роль в гуморальном иммунном ответе на внешние возбудители инфекционных заболеваний. Кроме того, иммуноглобулины и, в частности, иммуноглобулины класса IgG могут появляться в случае безвредных в норме антигенов, например, вдыхаемых антигенов или пищевых антигенов. Обычно заболевание представляет собой экзогенные аллергические альвеолиты, которые могут быть вызваны воздействием веществ, содержащихся в воздухе на рабочем месте. Обычно это плесневые или бактериальные компоненты, но также это могут быть и экскременты, тонкодисперсные порошки или химические компоненты, которые вдыхаются в форме пыли или аэрозолей во время работы. Болезнь, известную как легкое фермера, вызывают термофильные актиномицеты, присутствующие в плесневелом сене. Заболевания такого рода представлены болезнью легкого фермера, болезнью легкого солодолопатчика и болезнью работающих с древесной массой, а также аллергозом голубевоодов. Кроме того, известно, что рыбная мука, опилки, меховая пыль и химические компоненты тоже могут вызывать альвеолит.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест на специфические IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа (IgG-ELISA) предназначен для количественного определения специфических IgG к вдыхаемым антигенам в сыворотке и плазме человека и помогает диагностировать так называемые реакции III типа со стороны легких (например, легкое фермера, легкое солодолопатчика, болезнь работающих с древесной массой и аллергоз птицеводов).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест на специфические IgG (sIgG) основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Он позволяет обнаруживать специфические IgG у пациентов с аллергиями III типа (экзогенные аллергические альвеолиты). Разведенные образцы сыворотки или плазмы пациентов инкубируют в стрипах с микролунками, на которые нанесены антигены. Во время инкубации специфические IgG связываются с антигенами, нанесенными на поверхность микролунок. После нанесения конъюгата антител к IgG человека с щелочной фосфатазой образуется комплекс антиген/IgG/конъюгат антител к IgG человека с щелочной фосфатазой. После внесения раствора р-нитрофенил-фосфата (pNPP) проводят количественное определение комплекса антител с ферментом. После добавления натрия гидроксида (NaOH) экстинкция окрашенного продукта реакции, пропорциональная количеству специфических IgG в образце, может быть измерена на длине волны 405 нм (референсная длина волны 620 нм). Калибровочные стандарты с известными концентрациями IgG используют для получения калибровочной кривой, по которой можно определять концентрации IgG.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Реагенты

Анти IgG ферментативный конъюгат
Концентрированный буфер для промывки C (50x)
Буфер для разведения
Субстратный буфер
Стоп-раствор (1N NaOH)
Таблетки субстрата (PNPP)

REF № 10100PG

1 флакон x 10 мл
1 флакон x 30 мл
1 флакон x 100 мл
1 флакон x 25 мл
1 флакон x 10 мл
5 шт x 5 мг

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

1. Набор калибраторов

Референсные стрипы
Калибровочные стандарты (0.25, 0.83, 2.5, 8.3, 25 мкг/мл)
Положительный контроль
Отрицательный контроль

REF № 12001PG

6 шт x 8 лунок
5 флаконов x 1,0 мл
1 флакон x 1,0 мл
1 флакон x 1,0 мл

2. Стрипы

Стрипы, разъединяющиеся на ячейки, с иммобилизованными в лунках моно и микстами аллергенов

REF Каталожный № аллергена + G

1 стрип x 8 лунок

НЕОБХОДИМОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Пипетки на 10-100 мкл, 200-1000 мкл, многоканальная пипетка, наконечники, пробирки для разбавления образцов, мерный цилиндр, микропланшетный фотометр, инкубатор, плёнка для закрытия ячеек. Дополнительно: микропланшетный вошер (устройство для промывания микропланшетов).

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного анализа можно использовать сыворотку или плазму пациента. Для сохранения целостности образца никакие добавки или консерванты не требуются. При температуре 2-8°C образцы стабильны в течение 48 часов после взятия образцов. При невозможности провести анализ в течение 48 часов или если нужна транспортировка образца, образец необходимо закрыть и заморозить. Следует избегать повторного замораживания и размораживания. Замороженные образцы следует размораживать при комнатной температуре (комнатная температура, 20-25°C) и, аккуратно переворачивая, тщательно перемешивать перед анализом. Не рекомендуется использовать гемолизированные или липемические образцы.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Неиспользуемые микротитровальные стрипы нужно надлежащим образом повторно герметично упаковать в имеющийся пакет из фольги с осушителем. Прежде чем использовать все реагенты, обеспечьте достижение ими комнатной температуры.

Конъюгат: Готов к применению

Калибровочные стандарты и контроли: Готов к применению

Буфер для разведения: Готов к применению

Стоп-раствор: Готов к применению

Раствор субстрата: Для 20 определений растворите одну таблетку субстрата в 5 мл субстратного буфера приблизительно за один час до использования, и храните в темном месте.

Промывочный раствор: Концентрированный промывочный буфер необходимо развести водой высокой степени очистки в соотношении 1:50. (Например, для 2 стрипов нужно 10 мл промывочного раствора. Поэтому 200 мкл концентрированного промывочного буфера нужно развести водой высокой степени очистки до получения конечного объема 10 мл). Полученный таким образом промывочный буфер стабилен в течение одной недели при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Подготовьте протокол для проведения анализа. Калибровочные стандарты и контроли рекомендуется анализировать в двух повторностях.
2. Разведите образцы пациентов в соотношении 1:101, используя для этой цели буфер для разведения (10 мкл сыворотки + 1 мл буфера для разведения).
3. Поместите нужные лунки с нанесенным покрытием в рамку и снова надлежащим образом герметично закройте пакет из алюминия с оставшимися стрипами и осушителем.
4. С помощью пипетки перенесите ровно 100 мкл калибровочных стандартов, контролей и образцов пациентов в соответствующие, предназначенные для них лунки.
5. Накройте планшет и инкубируйте один час при 37°C.
6. Промойте планшет вручную или используйте для этой цели подходящее устройство для промывания планшетов для ИФА анализа (ELISA), промывать необходимо 3 раза, каждый раз используя 300 мкл на лунку. После промывки удалите остатки жидкости, выстучав микропланшет на бумажное полотенце.
7. С помощью пипетки перенесите ровно 100 мкл конъюгата с антителами к IgG в каждую лунку, накройте планшет и инкубируйте один час при 37°C.
8. Повторите процедуру промывания, как описано в пункте 6.
9. С помощью пипетки внесите 200 мкл раствора субстрата (p-нитрофенил-фосфат в субстратном буфере) в каждую лунку, накройте и инкубируйте 30 минут в темноте при 37°C.
10. С помощью пипетки в каждую лунку внесите 50 мкл стоп-раствора в том же порядке, что и субстрат.
11. Инкубируйте 5 минут при комнатной температуре и оставьте раствор гомогенизироваться.
12. На длине волны 405 нм измерьте значения оптической плотности (референсная длина волны 620 нм), используя соответствующий микропланшетный ридер, обслуживание которого осуществляется регулярно.

10 мкл Сыворотки + 1 мл Буфера

100 мкл Калибраторов / Контролей / Образца

3-х кратная промывка



1 час при 37°C

100 мкл Конъюгата

3-х кратная промывка



1 час при 37°C

200 мкл Субстрата



30 минут при 37°C

50 мкл Стоп-раствора



Считывания результатов через 5 минут, на длине волны 405 нм, в сравнении с длиной волны 620 нм



ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Клиническая важность положительного результата анализа значительно варьирует в зависимости от конкретных антигенов. Поэтому рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно определяла ожидаемые значения для конкретных популяций за определенный период времени посредством статистически значимого количества анализов, прежде чем результаты анализа приобретут клиническую значимость. Указанные выше значения можно использовать в качестве ориентира для получения собственных результатов.

АЛЛЕРГЕНЫ С КОНТРОЛЬНЫМ СТРИПОМ HSA

Низкомолекулярные вещества (гаптены), например, пенициллин и изоцианаты, на микротитровальных стрипах иммобилизованы белком (человеческий сывороточный альбумин / HSA). В редких случаях образцы пациентов могут содержать специфические IgG к HSA. Поэтому для каждого образца пациента необходимо проверять реакцию на сам HSA посредством анализа лунки с HSA-контролем и сравнения результатов с конъюгатом антигена с HSA.

Рекомендуемая интерпретация:

Концентрацию специфического IgG в присутствии конъюгата с HSA измеряют параллельно с определением специфических IgG к HSA. Концентрацию специфических IgG к HSA следует вычесть из концентрации, полученной при анализе соответствующего конъюгата с HSA.

Альтернативная интерпретация:

Результат определения конъюгата антигена с HSA вычисляют путем умножения значения оптической плотности (ОП) стрипа с HSA-контролем на 2.

Пороговое значение = ОП (стрип с HSA-контролем) x 2

ОП конъюгата антигена с HSA > Пороговое значение: положительный результат.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для вычисления результатов рекомендуется использовать прошедшее валидацию программное обеспечение. Для вычисления вручную, по данным, полученным при анализе калибровочных стандартов и контролей, вычисляют средние значения оптической плотности (ОП) (Δ 450 нм - 620 нм). По средним значениям ОП пяти калибровочных стандартов строят график на полулогарифмической бумаге (абсцисса: \log Ед. IgG /мл; ордината: линейная ОП Δ 450 нм - 620 нм) для получения стандартной кривой. Концентрацию sIgG в образце пациента определяют на основе этой стандартной кривой. Значение ОП откладывают по оси ординат, результат в мкг/мл можно прочесть по оси абсцисс. Стандартная кривая и контроли должны соответствовать диапазону приемлемых значений, указанных в Сертификатах контроля качества, которые поставляются вместе с набором. В противном случае необходимо проверить условия проведения анализа и, вероятно, повторить анализ.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По калибровочной кривой рассчитывают концентрации sIgG в образцах, выражая их как классы или в международных единицах на мл мкг/мл), и оценивают следующим образом:

мкг/мл sIgG	Интерпретация
< 1,0	Отрицательный
1,0 - 2,0	Неопределенный
2, 0 - 3,5	Положительный
> 3,5	Высоко положительный

Вариабельность и воспроизводимость**1. Результаты в пределах одной серии анализов**

Образец	Значение мкг/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	178	5,8
2 (n=10)	53	6,6
3 (n=10)	237	7,0

2. Результаты между сериями анализов

Образец	Значение мкг/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=20)	161	13,5
1 (n=20)	58	10,5
1 (n=20)	239	7,7

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Концентрация, калибровочный стандарт (мкг/мл)	Среднее значение ОП 405 нм	Диапазон значение ОП 405 нм
0,25	0,173	0,200 ± 0,100
0,83	0,298	0,300 ± 0,100
2,5	0,661	0,750 ± 0,150
8,3	1,774	1,800 ± 0,300
25	2,820	3,000 ± 0,500

ЛИТЕРАТУРА

1. Garcia et al: Modifications in IgG subclass in the course of immunotherapy with grass pollen. J Invest Allergol Clin Immunol 1993, 3:19-25.
2. Hedlin et al: Long-term follow up of patients treated with a three-year course of cat or dog immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1995, 96:79-85.
3. Moss RB: IgG Subclass Antibody Markers in Grass pollen Immunotherapy. N Eng Reg Allergy Proc 1987, 8:409-415.
4. Nakagawa T: IgG Subclass Antibodies in Response to House Dust Mite Immunotherapy. N Eng Reg Allergy Proc 1987, 8:423-428.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. В соответствии со статьей 1, параграф 2b, Европейской директивы 98/79/ЕС, для использования медицинских изделий для диагностики in-vitro производителем предусмотрено обеспечение пригодности, технических характеристик и безопасности продукта. Поэтому необходимо строго следовать процедуре анализа, информации, особым указаниям и мерам предосторожности, изложенным в инструкциях по применению. Набор необходимо использовать только в соответствии с описанием, представленным на странице 1 (предназначение).
2. Тест необходимо проводить в соответствии с данной инструкцией, в которой представлена вся необходимая информация, а также особые указания и меры предосторожности. Необходимо подвергнуть проверке использование наборов для анализа вместе с анализаторами или аналогичным оборудованием. Никакие изменения конструкции, состава или процедуры анализа, равно как и использование в сочетаниях с другими продуктами, не одобренными производителями, не разрешены; за такие изменения, которые могут привести к ложным результатам и другим инцидентам, ответственность несет сам пользователь. Производитель не несет ответственности за любые результаты визуального анализа образцов пациентов.
3. Набор предназначен для использования только обученными и квалифицированными специалистами, проводящими исследования или осуществляющими диагностику. Беременные женщины не должны проводить данный анализ.
4. Лабораторное оборудование следует содержать в соответствии с инструкциями производителя, перед применением необходимо проверить правильность его работы.
5. Только для диагностического применения in-vitro. Только для однократного применения. Не используйте компоненты с истекшим сроком годности. Не сочетайте с данным набором реагенты других поставщиков или компоненты наборов из других партий (если только на странице 1 не указано иное).
6. Не используйте компоненты набора, если упаковка компонента повреждена. Пожалуйста, прежде чем использовать, проверьте все растворы на предмет микробного загрязнения. Сразу же после использования плотно закрывайте флаконы, чтобы избежать испарения и микробного загрязнения. Не меняйте заворачивающиеся крышки флаконов с реагентами.
7. Набор прошел оценку для использования при температурах, указанных в Схеме проведения анализа (смотрите страницу 2). Более высокие или более низкие температуры могут привести к получению значений, не соответствующих диапазонам контроля качества.

8. Процедура промывания безусловно важна. Неправильное промывание станет причиной ошибочных результатов. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку и автоматическое устройство для промывки.
9. Чтобы избежать перекрестного загрязнения и ложноположительных результатов рекомендуется проводить все этапы пипетирования надлежащим образом. Используйте только чистые наконечники для пипеток, дозаторы и лабораторную посуду.
10. Диагностические компоненты, полученные на основе сыворотки крови человека, были протестированы методом с маркировкой SE на антитела к ВИЧ 1/ВИЧ 2, антитела к ядерному антигену вируса гепатита В, антитела к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В, и были признаны отрицательными. Тем не менее, с материалами на основе сыворотки крови человека, следует обращаться как с потенциально инфицированными (БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ).
11. Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин, который, по данным производителя, не несет в себе никакой известной возможности инфицирования. Поскольку иногда могут встречаться неподдающиеся обнаружению возбудители инфекции, мы рекомендуем обращаться с любым продуктом животного происхождения как с потенциально заразным.
12. В отношении всех реагентов необходимо соблюдать следующие правила безопасности:
- Не допускать попадания в глаза, на кожу или на одежду (P262). Не вдыхать спрей (P260). Никогда не следует осуществлять пипетирование с помощью рта, всегда необходимо использовать подходящие устройства для пипетирования.
 - В СЛУЧАЕ ПРОГЛАТЫВАНИЯ: прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту (P301/330/331)
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ НА КОЖУ (или на волосы): Сразу же удалить/снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/душем (P303/361/353).
 - В СЛУЧАЕ ВДЫХАНИЯ: Вывести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить покой в положении, удобном для дыхания (P303/340).
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ В ГЛАЗА: Осторожно промывать водой в течение нескольких минут. Если есть контактные линзы, снять их, если это не сложно. Продолжить промывание глаз. (P305/351/338)
 - Во время проведения анализа нельзя есть, пить и курить. Нельзя держать поблизости продукты питания, корма и напитки.
 - Необходимо надевать защитные перчатки/защитную одежду/средства для защиты глаз (P280). Следует тщательно мыть руки после обращения с продуктом (P264) и обеспечить уход за кожей.
 - По запросу может быть предоставлен паспорт безопасности вещества.
13. Стоп-раствор вызывает тяжелые ожоги кожи и травмы глаз (H314).
14. ТМБ в высоких концентрациях может быть потенциально мутагенным. В связи с низкой концентрацией ТМБ в данном растворе субстрата мутагенный эффект можно исключить, при условии надлежащего способа применения.
15. Консерванты (Бронидокс, Тимеросал, Азид) токсичны для водных организмов, но их концентрация не опасна для окружающей среды. При утилизации большие объемы реагентов следует смывать большим количеством воды. Тимеросал (Промывочный буфер В) может вызывать поражение органов при длительном или многократном воздействии (H373).
16. Отходы, в составе которых присутствует сыворотка, следует собирать в отдельные контейнеры, содержащие надлежащее дезинфицирующее средство в достаточной концентрации. С данным веществом следует обращаться в соответствии с национальными руководствами или нормативами, касающимися биологической опасности и безопасности.
17. Настоящим отсылаем вас к национальным нормативам по медицинским изделиям, касающимся наборов для анализов, предназначенных для in-vitro диагностики.