

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КОНЦЕНТРАЦИЙ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ IgG4
В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

Specific IgG4 ELISA

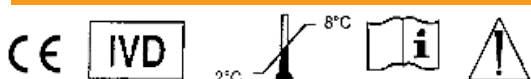
Enzyme Immuno Assay for the quantitative determination
of specific IgG4 antibodies
in human Serum or Plasma

С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛЕРГЕНОВ НАНЕСЕННЫХ В ЛУНКИ ЛОМКИХ СТРИПОВ
Тест на специфические IgG4 методом твердофазного иммуноферментного анализа
(IgG4-ELISA)

Номер по каталогу **REF 10104PG**  96 определений

Номер по каталогу **REF 12004PG**  6 постановок

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



ВВЕДЕНИЕ

Иммуноглобулины (Ig) подкласса IgG4 играют важную роль в гуморальном иммунном ответе во время иммунотерапии, например, в случае ядов насекомых (пчелы и осы). Повышение концентрации специфических IgG4 указывает на положительную реакцию на иммунотерапию. Отмечено, что специфические IgG4 конкурируют со специфическими IgE за связывание с соответствующим антигеном (аллергеном). Поэтому считается, что специфические IgG4 уменьшают способность тучных клеток и базофильных гранулоцитов к дегрануляции.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест на определение IgG4 методом твердофазного иммуноферментного анализа (IgG4-ELISA) предназначен для определения специфических IgG4 в сыворотке или плазме человека и поэтому разработан таким образом, чтобы контролировать титры специфических IgG4 во время лечения повышенной чувствительности.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест-система работает на основе метода твердо-фазного иммуноферментного анализа (ELISA) и позволяет определять антиген-(аллерген-) специфические антитела подкласса IgG4 в сыворотке или плазме человека. Разведенную сыворотку или плазму инкубируют в стрипах с нанесенным на их поверхность антигеном (аллергеном). Специфические IgG4 реагируют с соответствующим аллергеном. Несвязанные антитела удаляются промыванием. Связанные аллерген-специфические антитела распознаются вторичным антителом к IgG4 человека, конъюгированным с пероксидазой хрена. Связанные комплексы IgG4/антитела к IgG4/пероксидаза хрена промывают, добавляют раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубируют с получением в итоге синего цвета. После прекращения ферментативной реакции с помощью кислоты происходит окрашивание в желтый цвет. Оптическую плотность (ОП) окрасившегося продукта измеряют спектрофотометрически на длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм). Концентрация sIgG4 в образце пациента пропорциональна значению оптической плотности. Калибровочные стандарты с известными концентрациями IgG4 анализируют одновременно с образцами пациента для получения калибровочной кривой. Неизвестные концентрации IgG4 в анализируемых образцах рассчитывают по данной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Реагенты

Анти IgG4 ферментативный конъюгат
Концентрированный буфер для промывки В (50х)
Субстрат ТМБ
Стоп-раствор (0,5 М H₂SO₄)
Буфер для разведения

REF № 10104PG

1 флакон x 10 мл
1 флакон x 30 мл
1 флакон x 12 мл
1 флакон x 6 мл
1 флакон x 100 мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

1. Набор калибраторов

Референсные стрипы
Калибровочные стандарты (100,250,500,2500 нг/мл)
Положительный контроль
Отрицательный контроль

REF № 12004PG

6 шт x 8 лунок
4 флакона 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

Прежде чем использовать все реагенты, обеспечьте достижение ими комнатной температуры.

Конъюгат: готов к применению

Калибровочные стандарты и контроли: готовы к применению

Буфер для разведения: готов к применению

Стоп-раствор: готов к применению

Субстрат ТМБ: готов к применению

Промывочный раствор: разведите 30 мл концентрата промывочного буфера дистиллированной водой (конечный объем 750 мл). Полученный таким образом промывочный буфер стабилен в течение 1 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 нужное количество эталонных лунок с калибровочными стандартами и контролями и нужное количество стрипов с нанесенным антигеном для образцов в рамку. Снова надлежащим образом герметично закройте пакет из алюминия с оставшимися лунками и осушителем.
4. С помощью пипетки перенесите 100 мкл калибровочных стандартов, контролей и 100 мкл разведенных образцов пациентов в соответствующие лунки (смотрите матрицу планшета).
5. Накройте стрипы фольгой для закрывания, чтобы предотвратить испарение, и инкубируйте в течение 1 часа при 37°C.
6. После инкубации снимите фольгу, проведите аспирацию раствора из всех лунок и промойте каждую лунку три раза, используя по 500 мкл промывочного раствора на лунку. Промывание можно проводить вручную или используя прошедшее валидацию устройство для промывания микропланшета. В конце тщательно удалите остатки жидкости, выстучав стрипы на полотенце.
7. С помощью пипетки перенесите 100 мкл конъюгата в каждую лунку и накройте стрипы фольгой. Инкубируйте 1 час при 37°C.
8. Повторите процедуру промывания, как описано в пункте 6.
9. С помощью пипетки перенесите по 100 мкл субстрата ТМБ в каждую лунку, накройте стрипы фольгой и инкубируйте 10 минут в темноте при комнатной температуре.
10. С помощью пипетки перенесите 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же хронологическом порядке, что и раствор субстрата, и аккуратно перемешайте. Рекомендуется перемешивать растворы в лунках, слегка постучав по рамке.
11. Подождите 5 минут, пока гомогенизируется субстрат. Сразу же прочитайте значение оптической плотности на длине волны 450 нм, используя для этой цели ридер для твердо-фазного иммуноферментного анализа (ELISA) (референсная длина волны 620 нм).

СМЕХА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

10 мкл Сыворотки + 1 мл Буфера

100 мкл неразбавленных Калибраторов / Контролей
100 мкл разбавленных Образцов

3-х кратная
промывка



1 час при 37°C

100 мкл Конъюгата

3-х кратная
промывка



1 час при 37°C

100 мкл Субстрата



10 минут в темноте
при комнатной
температуре

50 мкл Стоп-раствора



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



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 четырех калибровочных стандартов строят график на полулогарифмической бумаге (абсцисса: \log Ед. IgG4/мл; ордината: линейная ОП Δ 450 нм – 620 нм) для получения стандартной кривой. Концентрацию IgG4 в образце пациента определяют на основе этой стандартной кривой. Значение ОП откладывают по оси ординат, результат в нг/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.

ВНИМАНИЕ

Поскольку калибраторы не разбавляют, необходимо **умножить результаты образцов пациента на 101** для получения присутствующих в образце пациента концентраций специфических IgG4, **когда результаты вычисляются в ручную**. Если результаты рассчитываются с помощью программы ALLERG-O-SCREENING, никаких вычислительных шагов не требуется.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

нг/мл sIgG4

< 100

100-250

> 250

Интерпретация

Отрицательный

Пограничный

Положительный

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЯ

Концентрации IgG4 можно определять в диапазоне от 100 нг/мл до 2500 нг/мл. Для точного определения содержания IgG4, сыворотку с концентрациями IgG4, превышающими 2500 нг/мл, следует развести в более высоком соотношении и подвергнуть повторному анализу.

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость

1. Результаты в пределах одной серии анализов

Образец	Значение нг/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	204,8	7,55
2 (n=10)	140,4	14,88
3 (n=10)	215,4	6,99

2. Результаты между сериями анализов

Образец	Значение нг/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=20)	212,3	10,15
2 (n=20)	139,9	17,7
3 (n=20)	230,40	9,08

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Концентрация, калибровочный стандарт (нг/мл)	Среднее значение ОП 405 нм	Диапазон значение ОП 405 нм
100	0,182	0,150 ± 0,10
250	0,345	0,250 ± 0,15
500	0,595	0,600 ± 0,20
2500	2,000	2,000 ± 0,60

ЛИТЕРАТУРА

1. Aalberse R.C. et al.: Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy* 1993, 48:559-569.
2. Garcia et al.: Modifications in IgG subclass in the course of immunotherapy with grass pollen. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993, 3:19-25.
3. Harris et al.: The development of specific IgG4 after immunotherapy with standardized extracts. *N Engl Reg Allergy Proc* 1987, 8:429-435.
4. 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, 96:879-885.
5. Van der Zee & Aalbers: IgG4 and hyposensitization. *N Engl Reg Allergy Proc* 1987,8:389-391.

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 исследование 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 завинчивающиеся 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 СЕ 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.