

ІНСТРУКЦІЯ

по застосуванню набору реагентів для визначення антитіл класу IgE до харчових алергенів в сироватці (плазмі) крові людини, «Харчовий профіль 2»

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів для визначення антитіл класу IgE до харчових алергенів в сироватці (плазмі) крові людини, «Харчовий профіль 2» (далі - набір реагентів) призначений для напівкількісного виявлення антитіл людини класу Е до харчових алергенів та 3-х ССД-маркерів (f434, f435, f 49, f 420, f 95, f 237, f 242, f 94, f 343, f 44, f 255, f 84, f 92, f 33, f 259, f 87, f 73, f417, nApi g4, f85, nDau c1, nDau c4, f 31, f 218, f 25, AO, HP, BR) у сироватці або плазмі крові.

ПРИНЦИП

Набір реагентів дозволяє провести напівкількісне визначення in vitro антитіл класу IgE в сироватці або плазмі людини до харчових алергенів яблука, персика, абрикоса, вишні, груші, малини, суниці, сливи, ківі, банана, апельсина, винограду, дині, черешні, селери, моркви, болгарського перцю, томата та 3-х ССД-маркерів (f434, f435, f 49, f 420, f 95, f 237, f 242, f 94, f 343, f 44, f 255, f 84, f 92, f 33, f 259, f 87, f 73, f417, nApi g4, f85, nDau c1, nDau c4, f 31, f 218, f 25, AO, HP, BR). Набір реагентів включає тестові смужки, вкриті паралельними смугами 25 різних екстрактів харчових алергенів та алергокомпонентів і 3-х ССД маркерів. ССД маркери (аскорбатоксидаза, пероксидаза хрону, бромелаїн) мають перехресно-активні вуглеводні (карбогідратні) детермінанти (cross-reactive carbohydrate determinants, CCD), які свідчать про наявність перехресних реакцій.

На першому етапі реакції тестові смужки зволожуються, а потім інкубуються з досліджуваною сироваткою пацієнтів. Якщо зразки позитивні, специфічні антитіла IgE прикріпляться до алергенів, що нанесені на тестову смужку. Щоб виявити зв'язані антитіла, другу інкубацію проводять з детектором антитіл, після чого проводять третю інкубацію з використанням кон'югату міченого ферментом, і четверту – з розчином субстрату, який забезпечує кольорову реакцію.

СКЛАДОВІ НАБОРУ

Таблиця 1

№ п/п	Компоненти набору	Формат	Символ
1	Тестові смужки в інкубаційному лотку, покриті алергенами: f434, f435, f 49, f 420, f 95, f 237, f 242, f 94, f 343, f 44, f 255, f 84, f 92, f 33, f 259, f 87, f 73, f417, nApi g4, f85, nDau c1, nDau c4, f 31, f 218, f 25, AO, HP, BR	5x5	Тестові смужки в інкубаційному лотку
2	Позитивний контроль	1 x 300 мкл	Позитивний контроль
3	Негативний контроль	1 x 300 мкл	Негативний контроль
4	Розчин детектора антитіл	1 x 13,5 мл	Розчин детектора антитіл
5	Кон'югат, мічений ферментом, 10х концентрат (стрептавідин, мічений лужною фосфатазою)	1 x 1,35 мл	Кон'югат 10х
6	Буфер TRIS-NaCl, 10х концентрат	1 x 100 мл	Буфер TRIS-NaCl 10х
7	Розчин 0,1 М TRIS-буфера	1 x 11,5 мл	Розчин 0,1 М TRIS-буфера
8	Розчин BCIP	1 x 1,1 мл	Розчин BCIP
9	Розчин NBT	1 x 1,1 мл	Розчин NBT
10	Калібрувальна смужка	1 x 1 шт	Калібрувальна смужка
11	Інструкція	1 шт	----
12	Протокол оцінки	4 шт	----

ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ І ОБЛАДНАННЯ

- шейкер вертикальний (нахил качання платформи 0 – 12 градусів, швидкість качання платформи 0-50 обертів за хвилину);
- дозатори піпеточні об'ємом 200-1000 мкл, 20-200 мкл;
- наконечники одноразові об'ємом 200-1000 мкл, 20-200 мкл

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- ТІЛЬКИ ДЛЯ ПРОФЕСІЙНОЇ IN VITRO ДІАГНОСТИКИ.
- Не використовувати набір після закінчення терміну придатності.
- Не їсти, не пити і не палити в місцях роботи із зразками та наборами реагентів.
- Поводитися зі зразками так, як ніби вони містять інфекційні агенти. Дотримуватись встановлених заходів безпеки стосовно мікробіологічних ризиків і виконувати стандартні рекомендації по утилізації зразків.
- При роботі зі зразками використовувати захисний одяг: халат, рукавички та окуляри.
- Усі використані тестові смужки, зразки і потенційно забруднені матеріали слід утилізувати згідно з вимогами

REF DP0103-25-E

VER 19.12.2019р.



ОБМЕЖЕННЯ

1. Відтворюваність результатів тесту залежить від точності техніки піпетування, належного дотримання рекомендованих умов (температури, часу) інкубації, належного промивання тестових смужок та приготування та зберігання реагентів.

2. Результати, отриманні з використанням набору реагентів можуть бути використанні в якості додаткової інформації при діагностиці захворювання.

3. Цей набір реагентів є діагностичним засобом. Постановка клінічного діагнозу не може базуватися тільки на результатах тесту і повинна бути зроблена лікарем, після того як будуть оцінені всі клінічні та лабораторні данні.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ**ПІДГОТОВКА ТА СТАБІЛЬНІСТЬ РЕАКТИВІВ:**

Зверніть увагу! За 30 хвилин перед використанням набору, всі реактиви слід довести до кімнатної температури (18-25°C). Реагенти мають бути ретельно перемішані перед використанням. Відтворюваність результатів сильно залежить від точності піпетування, часу інкубації, температури, рівномірності промивання тестових смужок. Слід ретельно дотримуватись процедури тестування. При проведенні тесту слід уникати потрапляння прямих сонячних променів. Після першого використання реактиви будуть стабільні до зазначеної дати кінцевого терміну придатності, при умові їх зберігання при температурі від 2 до 8°C і захищенні від забруднення.

Тестові смужки в інкубаційному лотку, покриті алергенами: готові до використання і прикріплені до каналців інкубаційного лотку. Пластина інкубаційного лотку складається з 5 каналців, які призначені для постановки 5 аналізів.

Відкривати упаковку с тестовими смужками лише після того, як смужки досягнуть кімнатної температури, щоб запобігти створенню на них конденсату. Після першого відкриття пакету та часткового вилучення тестових смужок, необхідно забезпечити щільне закриття пакету з залишком тестових смужок для запобігання потраплянню вологи й зберігати при температурі від 2 до 8°C.

Позитивний контроль: напівготовий до застосування у ліофілізованому вигляді. Для приготування розчину позитивного контролю, необхідно розчинити ліофілізований осад у 300 мкл дистильованої води, дати розчинитися впродовж 1-2 хвилин, добре перемішати. Для проведення одного аналізу використовувати 300 мкл розчину позитивного контролю та 200 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Загальний об'єм розведеного розчину складає 500 мкл.

Негативний контроль: напівготовий до застосування у ліофілізованому вигляді. Для приготування розчину негативного контролю, необхідно розчинити ліофілізований осад у 300 мкл дистильованої води, дати розчинитися впродовж 1-2 хвилин, добре перемішати. Для проведення одного аналізу використовувати 300 мкл розчину негативного контролю та 200 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Загальний об'єм розведеного розчину складає 500 мкл.

Розчин детектору антитіл: розчин біотинильованих антитіл проти імуноглобуліну Е людини, готовий до використання.

Кон'югат, мічений ферментом, 10x концентрат: кон'югат мічений лужною фосфатазою напівготовий до застосування. Для приготування готового до використання кон'югату, з пробірки взяти необхідну кількість розчину, використовуючи чисту піпетку, і розвести у співвідношенні 1:9 робочим розчином TRIS-NaCl буферу. Для кожної смужки розвести 50 мкл кон'югату до 450 мкл однократного TRIS-NaCl буферу. Розведений кон'югат слід використати того ж робочого дня.

Буфер TRIS-NaCl, 10x концентрат: напівготовий до застосування. Для приготування однократного розчину буфера, з пробірки взяти необхідну кількість концентрату, використовуючи чисту піпетку, і розвести у співвідношенні 1:9 дистильованою водою (1 мл концентрату буферу : 9 мл води). Робочий однократний розчин буферу слід використати того ж робочого дня.

Розчин субстрату: готується перед застосуванням. Для приготування 500 мкл розчину субстрату взяти 40 мкл розчину BCIP, додати до нього 40 мкл розчину NBT та 420 мкл розчину 0,1 M TRIS-буфера. Приготовлений розчин субстрату має світло-жовтий колір. Розчин слід використати протягом 1 години.

ПІДГОТОВКА ТА СТАБІЛЬНІСТЬ ЗРАЗКІВ:

Матеріал зразків: людська сироватка або плазма крові з EDTA, гепарином або цитратом.

Стабільність: досліджувані зразки пацієнтів слід зберігати при температурі від 2 до 8°C до 14 днів. Розведені зразки потрібно використати протягом одного робочого дня.

Розведення зразків: для розведення використовувати 300 мкл досліджуваного зразка та 200 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу для одного аналізу. Загальний об'єм розведеної сироватки складає 500 мкл.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУВАННЯ:

Підготовка: взяти необхідну кількість каналців інкубаційного лотку з тестовими смужками з упаковки (якщо необхідно за один раз поставити менше 5 аналізів, пластину інкубаційного лотку можна розрізати). Після видалення необхідної кількості каналців з тестовими смужками з упаковки, необхідно забезпечити щільне закриття упаковки із залишком тестових смужок, для запобігання потраплянню вологи, й зберігати при температурі від 2 до 8°C.



Тільки для професійного використання

На першому етапі реакції тестові смужки необхідно зволожити додаванням 500 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Видалити вологу з кожного каналу інкубаційного лотка.

Зверніть увагу! На всіх кроках інкубації та промивання тестові смужки мають бути ретельно прикріплені до каналів інкубаційного лотку та повністю покриті робочим розчином (відповідним кожному кроку). Рекомендовані умови інкубації та промивання на вертикальному шейкері: нахил качання платформи - 12 градусів, швидкість качання платформи - 17 обертів за хвилину.

Інкубація (1-й крок) – заповнити кожен канал розведеним зразком в об'ємі 500 мкл (300 мкл досліджуваного зразка та 200 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу) та інкубувати впродовж 45 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері

Промивання – видалити вологу з кожного каналу інкубаційного лотка та промити впродовж 3 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері, використовуючи 500 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Повторити процедуру 5 разів.

Інкубація (2-й крок) – піпеткою додати у кожен канал 500 мкл розчину детектора антитіл та інкубувати впродовж 45 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері

Промивання – видалити вологу з кожного каналу інкубаційного лотка та промити 3 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері використовуючи 500 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Повторити процедуру 5 разів.

Інкубація (3-й крок) – піпеткою додати у кожен канал 500 мкл розведеного розчину кон'югату, та інкубувати впродовж 20 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері.

Промивання – видалити вологу з кожного каналу інкубаційного лотка та промити 3 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері, використовуючи 500 мкл робочого розчину TRIS-NaCl буферу. Повторити процедуру 5 разів.

Інкубація (4-й крок) – у кожен канал інкубаційного лотку піпеткою додати 500 мкл розчину субстрату та інкубувати впродовж 2 хв. при кімнатній температурі на вертикальному шейкері до появи на тестовій смужці кольорової реакції в зоні контрольної смуги, яка за інтенсивністю забарвлення відповідатиме 6 класу, та за наявності тестових смуг різної інтенсивності забарвлення.

Закінчення: видалити вологу з кожного каналу інкубаційного лотка та промити кожен смужку дистильованою водою впродовж 1 хв. 3 рази на вертикальному шейкері.

Проявлені тестові смужки залишити у лунках інкубаційного лотка до повного висихання протягом 20 хвилин. Ще вологі інкубовані смужки демонструють фонове забарвлення, яке зникає після повного висихання. Тому оцінювання стрічок слід проводити лише після того, як стрічки висохнуть повністю.

Після повного висихання, тестові смужки слід дістати з лунки інкубаційного лотка за допомогою пінцета:

- загостреним краєм пінцета провести між нижньою стороною висушеної проявленої тестової смужки і дном лунки інкубаційного лотка, тим самим відклеїти тестову смужку від лунки.

Відклеєну тестову смужку перенести на протокол оцінювання або на столик сканера для зчитування результатів за допомогою програми. Слід уникати ушкодження верхньої частини тестової стрічки.

ОЦІНЮВАННЯ ТА ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Візуальне оцінювання

Проявлені просушені тестові смужки розмістити на оціночному протоколі випробувань та підрівняти відповідно позначкам на оціночній матриці. За допомогою калібрувальної смужки оцінити інтенсивність проявлених полос на тестовій смужці (Таблиця 2). Результати оцінки, виражені в класах, занести у протокол оцінювання.

Зверніть увагу! На початку тестової смужки знаходиться контрольна смужка (SC), якщо вона чітко виражена, та інтенсивно забарвлена (на рівні 5-6 класу), то всі кроки реакції були проведені вірно. Деякі зразки можуть демонструвати темне фонове забарвлення тестової смужки та білі смужки в місцях розташування алергенів. Ці неспецифічні реакції повинні тлумачитись, як негативні. **Відсутність (або низька інтенсивність забарвлення) контрольної смужки вказує на невірне проведення аналізу. Інкубацію слід повторити з новими реактивами.**

Таблиця 2

Клас	Характеристика	Результат
0	Немає забарвлення	Негативний; не виявлено специфічних антитіл, не має жодного клінічного значення
1	Слабо помітна смуга	Дуже слабка концентрація антитіл, частіше без клінічних симптомів, низька концентрація алергену специфічного IgE; часткове клінічне значення
2	Виражена смуга	Слабка концентрація антитіл, частіше без клінічних симптомів, в той час як сенсibilізація присутня досить низька концентрація алергену специфічного IgE; має клінічне значення
3	Чітко виражена смуга	Виявлений значний рівень антитіл, середня концентрація алергену специфічного IgE; часто з клінічними симптомами
4	Інтенсивно виражена смуга	Виявлений високий рівень антитіл. Майже завжди з клінічними симптомами концентрація алергену вища середнього рівня специфічного IgE



5/6	Дуже добре виражена смуга	Дуже високий титр антитіл висока концентрація алергену специфічного IgE; клінічні симптоми в більшості випадків
-----	---------------------------	---

Розташування антигенів на тестовій смужці

	SC (контрольна смуга)
	BR (бромелайн)
	HP (пероксидаза хрону)
	AO (аскорбатоксидаза)
	f 25 (томат (екстракт))
	f 218 (болгарський перець (екстракт))
	f 31 (морква (екстракт))
	Алергокомпонент моркви (профілін)
	Алергокомпонент моркви pDau c1 (PR-10)
	f85 (селера (екстракт))
	Алергокомпонент селери pApi g4 (профілін)
	f417 (алергокомпонент селери gApi g1(PR-10))
	f 73 (черешня (екстракт))
	f 87 (диня (екстракт))
	f 259 (виноград (екстракт))
	f 33 (апельсин (екстракт))
	f 92 (банан (екстракт))
	f 84 (ківі (екстракт))
	f 255 (слива (екстракт))
	f 44 (суниця (екстракт))
	f 343 (малина (екстракт))
	f 94 (груша (екстракт))
	f 242 (вишня (екстракт))
	f 237 (абрикос (екстракт))
	f 95 (персик (екстракт))
	f 420 (алергокомпонент персика pPru p3 (nsLTP))
	f 49 (яблуко (екстракт))
	f435 (алергокомпонент яблука gMal d3 (nsLTP))
	f434 (алергокомпонент яблука gMal d1 (PR-10))

Кількісне оцінювання

Проявлені просушені тестові смужки покласти на столик сканера Improvio або RapidReader контрольною смугою ближче до лівої сторони. Система фотографує тестові смужки, а програмне забезпечення оцінює забарвлення ліній алергену. У випадку кожного алергену інтенсивність кольору на тестових смужках прямо пропорційна кількості специфічних антитіл IgE в сироватці крові пацієнта і виражена у класах від 0 до 6 (Таблиця 3).

Взаємозв'язок між виявленими класами та вмістом специфічних IgE до алергенів у сироватці пацієнтів

Таблиця 3

Значення в МО/мл	Клас	Результат
0,00-0,34	0 (0,0-0,9)	Специфічних IgE антитіл не знайдено
0,35-0,69	1 (1,0-1,9)	Дуже низький вміст антитіл, зазвичай без клінічних проявів
0,70-3,49	2 (2,0-2,9)	Низький вміст антитіл, наявність сенсibilізації, часто з клінічними проявами
3,50-17,49	3 (3,0-3,9)	При виявленні антитіл часто присутні клінічні прояви
17,50-49,99	4 (4,0-4,9)	Високий титр антитіл, з клінічними проявами
50,00-99,99	5 (5,0-5,9)	Дуже високий титр антитіл
≥100	6 (≥6,0)	Надзвичайно високий титр антитіл

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Діапазон виміру: напівкількісний

Чутливість та специфічність: чутливість та специфічність тесту визначені за допомогою стандартів підприємства та в клінічних дослідженнях і становлять: чутливість 88 %; специфічність 95 % для здорових донорів крові.

Внутрішньопартійна точність була визначена на зразках стандартних позитивних сироваток. У всіх повторях інтенсивність забарвлення смуг була в межах зазначеного діапазону.



Тільки для професійного використання

Міжпартійна точність була визначена за допомогою 15 незалежних аналізів на стандартних позитивних зразках. Три різні партії наборів реагентів були протестовані, використовуючи ці зразки. Зразки були правильно ідентифіковані у випадках >99%.

ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір реагентів слід зберігати при температурі від 2°C до 8°C протягом 1 року. Не заморожувати. Компоненти набору стійкі до зазначеної дати кінцевого терміну придатності, при умові збереження цілісності упаковки виробника.

