

**IgE**
ИМУНОГЛОБУЛИН Е**ИН ВИТРО ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ИМУНОГЛОБУЛИН Е (IgE) В СЕРУМ.****ВЪВЕДЕНИЕ**

Установено е, че пациенти с atopични алергични болести като atopична астма, atopичен дерматит и сенна хрема имат повишено ниво на общия имуноглобулин Е в кръвта. IgE е известен и като реагенно анти тяло. По принцип повишените нива на IgE са индикация за повишена вероятност за IgE-опосредствана свръхчувствителност, отговорна за алергичните реакции. Паразитни нахлувания, например на глисти, както и някои клинични нарушения включително аспергилоза също причиняват високи нива на IgE. Понижени нива на IgE се наблюдават в случаи на хипогамаглобулинемия, автоимунни болести, язвен колит, хепатит, рак, малария. Нивата на IgE в серума могат да имат прогностична стойност при оценка на риска за бъдещи алергични състояния при децата.

Концентрацията на IgE в пациента зависи както от степента на алергичната реакция, така и от броя на различните алергени, към които пациентът е чувствителен. При нормални индивиди без алергии концентрациите на IgE варират широко и се повишават постоянно през детството, като достигат най-високи нива около 15-20 годишна възраст. След това остават постоянни до около 60-годишна възраст, когато започват бавно да се понижават.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Концентрацията на IgE е право пропорционална на наситеността на получения при реакцията цвят на пробата. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 450 nm.

РЕАГЕНТИ

1. Anti-IgE coated microtiter plate, 96 wells
2. Zero Buffer, 13 ml
3. Reference Standards: 0, 10, 50, 100, 400 and 800 IU/ml течни.
4. Enzyme Conjugate Reagent, 18 ml
5. TMB Reagent, готов, 11 ml
6. Stop Solution (1N HCl), 11 ml.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА ТЕСТА

Неотворените тестове трябва да се съхраняват при 2-8°C в затворената си опаковка с торбички поглъщащи влагата, за да се сведе до минимум излагането на влажен въздух. Отворените тестове остават стабилни до изтичане на срока на годност, ако се съхраняват както е описано по-горе. Тестовите могат да се използват на апарат с ширина на честотната лента 10 nm или по-малка, оптична плътност 0-2 OD или повече при 450 nm дължина на вълната.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Внимание: Този тест съдържа човешки материал. Източникът на този материал е тестван отрицателен за HbsAg, HIV1/2 и HCV, но никои наличен метод не може да гарантира напълно отсъствието им. Следователно третирайте всички кръвни продукти и проби като потенциално заразни. Спазвайте националните разпоредби за работа с биологично опасни материали.
2. Не използвайте реактивите след изтичане на срока на годност и не смесвайте компоненти от кутии с различен партиден номер.
3. Не използвайте реактива, ако е станал замърсен и мътен.
4. Не използвайте ереактива, ако шишенцето е пукнато или повредено.
5. Веднага поставйте капачките и не радзменяйте капачките на различни шишенца.
6. Всяка ямка може да се използва само веднъж.
7. Не пипетирайте с уста.
8. Разтвори съдържащи добавки или консерванти, например натриев азид не трябва да се използват при ензимни реакции.
9. Избягвайте контакт с 1N HCl – може да причини дразнене или изгаряне на кожата. В случай на контакт измийте обилно с вода и потърсете лекарска помощ, ако дразненето продължи.
10. Само за ин витро диагностична употреба.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Трябва да се използва серум, приготвен по стандартните лабораторни техники. Не използвайте силно хемолизирани, липемични или мътни проби. Пробите могат да се съхраняват при 2-8°C до 48 часа. За по-дълги периоди на съхранение трябва да се замразят до -20°C. След размразяване обърнете нагоре-надолу няколко пъти.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

1. Всички реагенти трябва да се поставят при стайна температура преди употреба.
2. Завъртете леко шишенцата за да се размесят. Не предизвиквайте разпенване.
3. Проби с очаквани стойности на естрадиол над 800 IU/ml трябва да се разреждат с преди да се изследват. Препоръчва се начално разреждане 1:100.

БЕЛЕЖКИ ПО ПРОЦЕДУРАТА

1. Мануално пипетиране: Препоръчва се да не изследвате едновременно повече от 32 ямки. Пипетирането на всички стандарти, проби и контроли трябва да се извърши в рамките на 3 минути.

2. Автоматично пипетиране: Може да се пусне цяла плака с 96 ямки наведнъж. Но се препоръчва пипетирането на всички стандарти, проби и контроли да се извърши в рамките на 3 минути.
3. Всички стандарти, проби и контроли, които се пускат в дублиращо измерване трябва да се пускат едновременно, за да са поставени при еднакви условия.
4. Препоръчва се всички ямки да бъдат отчетени до 15 минути след досбавянето на Stop Solution.

ПРОЦЕДУРА

1. Поставете желания брой ямки в носача.
2. Пипетирайте 20 µl от стандартите, пробите и контролите в съответните ямки.
3. Пипетирайте 100 µl от Zero Buffer във всяка ямка.
4. Разбъркайте добре в продължение на 10 секунди. Доброто размесване е много важно.
5. Инкубирайте при стайна температура (18-25°C) 30 минути.
6. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци.
7. Измийте ямките с дестилирана или дейонизирана вода 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате ямките. (Не използвайте чешмяна вода.)
8. Изтупайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
9. Пипетирайте 150 µl от Enzyme Conjugate Reagent във всяка ямка. Разбъркайте леко в продължение на 10 секунди.
10. Инкубирайте при стайна температура 30 минути.
11. Отстранете инкубационната смес като изпразните плаката с ямките в контейнер за отпадъци.
12. Измийте ямките с дестилирана или дейонизирана вода 5 пъти, като преди всеки следващ път изпразвате ямките.
13. Изтупайте рязко ямките върху попиваща хартия или салфетки, за да се отстранят останалите капки вода.
14. Пипетирайте 100 µl TMB реагент във всяка ямка. Леко разбъркайте 5 секунди.
15. Инкубирайте при стайна температура 20 минути.
16. Спрете реакцията като добавите 100 µl Stop Solution във всяка ямка.
17. Леко разбъркайте 30 секунди. Много е важно синият цвят напълно да се превърне в жълт.
18. Отчетете абсорбцията при 450 nm с ELISA апарат до 15 минути.

ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средната абсорбция (A₄₅₀) за всеки комплект стандарти, контроли и проби на пациенти.
2. Конструирайте стандартна крива възоснова на абсорбцията и концентрацията на всеки реферетен стандарт.
3. Използвайте средната стойност на абсорбцията за всяка проба, за да определите съответната концентрация на IgE в IU/ml от стандартната крива.
4. Стойностите, получени от разреждени проби трябва да се конвертират като се умножат по съответния фактор на разреждане.

ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА КРИВА

Дадената като пример стандартна крива може да служи само като илюстрация и не трябва да се използва при изчисление на неизвестни проби. Всяка лаборатория трябва да получи свои собствени данни и стандартна крива.

IgE (IU/ml)	Абсорбция (450nm)
0	0.058
10	0.167
50	0.538
100	0.950
400	2.135
800	2.748

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ НА ТЕСТА

Общият IgE в нормални хора без алергии е < 150 IU/ml в серум. Минималната концентрация, която този тест може да открие е 5.0 IU/ml.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

1. Надеждни и възпроизводими резултати ще се получат ако описаната процедура е напълно разбрана и правилно изпълнена.
2. Процедурата с миенето е от критично значение. Недостатъчно доброто измиване ще повлияе на точността и ще доведе до фалшиво високи стойности на абсорбцията.
3. Резултатите от теста трябва да се използват само като една съставна част от диагностичната процедура, при която лекарят трябва да вземе пред вид цялата налична информация. Ниски или нормални резултати не могат да изключат напълно алергия, а високи резултати не означават задължително алергия.
4. Лека хемолиза или липемия не пречат на този тест. Наличието на седимент или преципитат в някои проби или реагенти може да е белег за замърсяване и те не трябва да се използват.

Rev:083006

Производител: BioCheck Inc., 323 Vintage Park Drive, Foster City, CA94404, USA
Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1