

ИНСТРУКЦИЯ

**Тест-система для количественного
определения аллерген-специфических IgE в сыворотке
или плазме человека с применением аллергодисков**

Ферментативный аллергосорбентный тест (EAST)

для диагностики *in vitro*

Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015 г.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Тел.: +7 (495) 799-1165
E-mail: info@fooke.ru
www.fooke.ru

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала полной версии инструкции по применению. Фирма изготовитель может, вкладывать в набор многоязычный вариант инструкции.

Specific IgE EAST **REF** 0540200PKL Σ 200 Определений**ВВЕДЕНИЕ**

За последние десятилетия во всем мире значительно возросла частота случаев аллергических заболеваний. Термин «аллергия» часто используется для обозначения реакций гиперчувствительности I типа (реакций немедленного типа), симптомы которых обычно появляются в течение 30-60 минут после контакта с аллергеном. Наиболее частыми симптомами являются: сенная лихорадка (ринит), конъюнктивит, крапивница (уртикарная сыпь), аллергическая астма и как самое опасное проявление – анафилаксия (анафилактический шок). Аллергены, вызывающие реакции гиперчувствительности I типа, в большинстве своем являются белками природного происхождения, например, пыльца растений, волосистой покров животных, пищевые продукты, клещи и яды насекомых. Характерной особенностью аллергии I типа является участие аллерген-специфических иммуноглобулинов (антител) класса E (sIgE). Поэтому выявление sIgE является важным средством современной диагностики аллергии.

НАЗНАЧЕНИЕ

Ферментативный алергосорбентный тест (EAST) на специфические IgE предназначен для количественного определения специфических IgE в сыворотке или плазме человека. Результаты учитываются при диагностике аллергии I типа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ферментативный алергосорбентный тест (EAST) на специфические IgE, предназначенный для количественного измерения специфических IgE, проводится на микротитровальных планшетах. На этапе первой инкубации образцы пациентов инкубируют на дисках с иммобилизованными аллергенами. Промыванием удаляют избыток компонентов сыворотки из лунки, в то время как аллерген-специфический IgE остается связанным. Затем добавляют антитело, меченое щелочной фосфатазой, что приводит к образованию комплексов аллерген/sIgE/конъюгат антител к IgE. Снова промывают лунки, добавляют раствор субстрата (п-нитрофенилфосфата pNPP) и инкубируют с получением в итоге желтого цвета, если присутствует конъюгат. Ферментативную реакцию останавливают с помощью натрия гидроксида (NaOH), оптическую плотность (ОП) окрашенного продукта реакции измеряют спектрофотометрически на длине волны 405 нм (референсная длина волны 620 нм). Концентрация sIgE в образце пациента пропорциональна ОП. Калибровочные стандарты с известными концентрациями IgE (калиброванные по стандарту ВОЗ 75/502) анализируют одновременно с образцами пациента для получения калибровочной кривой. Неизвестные концентрации IgE в анализируемых образцах рассчитывают по данной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Компоненты набора	Кат. №0540200PKL
Анти IgE ферментативный конъюгат	1 x 10,4 мл
Концентрированный буфер для промывки (50x)	1 x 30 мл
Субстратный буфер	1 x 50 мл
Таблетки субстрата (PNPP)	10 x 5 мг
Стоп-раствор (1N NaOH)	1 x 10 мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Набор стандартов на 6 постановок	Кат. №74000PQ
Эталонные диски с антителами к IgE	2 кассеты x 25 дисков
Калибровочные стандарты 0.35, 0.7, 3.5, 17.5 МЕ/мл	4 x 0,8 мл
Аллергодиски	Каталожный № аллергена

Контроли	Кат. №07001 / 07002
Положительный контроль	1 x 0,5 мл
Отрицательный контроль	1 x 0,5 мл

НЕОБХОДИМОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Пипетки объемом 10-100 мкл и 200-1000 мкл, дозатор Multipette, наконечники для пипеток, пробирки для разведения образца, стеклянный мерный цилиндр, ридер для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), фольга для закрывания, устройство для промывания микропланшетов, инкубатор (по выбору), лабораторные часы, дистиллированная вода.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного анализа можно использовать сыворотку или плазму. Для сохранения целостности образца никакие добавки или консерванты не требуются. Образцы необходимо хранить при 2-8°C и анализировать 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. **Образцы следует анализировать без разведения.** Не рекомендуется использовать гемолизированные или липемические образцы.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Все реагенты перед использованием довести до комнатной температуры.

Конъюгат с ферментом: готов к использованию
Калибровочные стандарты и контроли: готовы к использованию
Субстратный буфер: требуется свежеприготовленный
Стоп-раствор: готов к применению

Концентрированный промывочный буфер: концентрированный промывочный раствор необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:50 (Например для 2 стрипов потребуется 10 мл промывочного раствора. Следовательно 200 мкл концентрированного промывочного буфера нужно развести дистиллированной водой 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 рекомендуются анализировать в двух повторностях.
2. С помощью пластикового пинцета перенесите эталонные диски и диски с аллергенами в лунки планшета в соответствии со своим протоколом.
3. С помощью пипетки перенесите ровно 50 мкл калибровочного стандарта, контроля и образцов пациентов непосредственно на соответствующий диск. Накройте планшет и инкубируйте в соответствии с **Таблицей 1**.
4. После завершения инкубации промойте каждую лунку планшета с помощью соответствующего устройства для промывания планшетов для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) 4 раза, промывать следует 4 раза, используя по 1000 мкл разведенного промывочного буфера и применяя метод перелива (overflow).
5. С помощью пипетки перенесите ровно 50 мкл конъюгата антител к IgE на каждый диск. Накройте планшет и инкубируйте в соответствии с **Таблицей 1**.
6. Примерно за 1 час до использования приготовьте раствор субстрата и храните его в темном месте до тех пор, пока он не потребуется. Используйте одну таблетку на 5 мл субстратного буфера.
7. Повторите процедуру промывания, как описано в пункте 4.
8. С помощью пипетки перенесите 200 мкл раствора субстрата в каждую лунку и инкубируйте в соответствии с **Таблицей 1**.

9. Добавьте 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же порядке и с теми же интервалами, что и раствор субстрата. Рекомендуется перемешать раствор в лунках, слегка постучав по рамке. Инкубируйте планшет 5 минут при комнатной температуре. С помощью микропланшетного ридера прочитайте значение ОП на длине волны 405 нм (референсная длина волны 620 нм) и рассчитайте результаты по образцам и контролям, как описано на странице 4.

Таблица №1: Схема инкубации

	Описание анализа		
	Длительный	Короткий	Сокращенный
Сыворотка - инкубация	3 часа при КТ	2 часа 37°C	1 ч 37°C
Конъюгат - инкубация	18 часов при КТ	2 часа 37°C	1 ч 37°C
Субстрат - инкубация	45 минут при КТ	1 час 37°C	1 ч 37°C

КТ = комнатная температура

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА



ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для вычисления результатов рекомендуется использовать прошедшее валидацию программное обеспечение. Для вычисления вручную, вычисляют средние значения оптической плотности (ОП) для Калибровочных стандартов и контролей [Δ 405 нм – 620 нм]. По средним значениям ОП четырех калибровочных стандартов строят график на полулогарифмической бумаге (абсцисса: \log ME IgE/мл; ордината: линейная ОП Δ 405 нм – 620 нм) для получения стандартной кривой. Концентрацию sIgE в образце пациента определяют на основе этой стандартной кривой. Значение

Значение ОП откладывают по оси ординат, результат в МЕ/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. Классы RAST (радиоаллергосорбентного теста) определяют на основе концентрации, и результаты интерпретируют следующим:

Класс	МЕ/мл sIgE	Интерпретация
4	> 17,5	Очень высокий
3	3,50 - 17,50	Высокий
2	0,70 - 3,50	Средний
1	0,35 - 0,70	Низкий
0	< 0,35	Не поддается обнаружению

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Клиническая важность положительного результата анализа значительно варьирует в зависимости от конкретных аллергенов. Поэтому настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно определяла диапазон нормальных значений для каждого отдельного аллергена. Указанные выше значения можно использовать в качестве ориентира для интерпретации.

Аллергены с HSA

Низкомолекулярные аллергены (гаптены), например, пенициллин и изоцианаты и некоторые другие лекарственные и профессиональные аллергены иммобилизованы на дисках через (сывороточный альбумин человека / HSA). В редких случаях образцы пациентов могут содержать специфические IgE к HSA. Поэтому для каждого образца пациента необходимо проверять реакцию на сам HSA посредством анализа диска с HSA-контролем и сравнения результатов с конъюгатом аллергена с HSA.

Рекомендуемая интерпретация:

Концентрацию sIgE в присутствии конъюгата с HSA измеряют параллельно с определением sIgE к HSA. Концентрацию, установленную при анализе диска с HSA следует вычесть из концентрации, полученной при анализе соответствующего конъюгата с HSA.

Альтернативная интерпретация:

Результат определения контрольного диска с HSA вычисляют путем умножения значения оптической плотности (ОП) диска с HSA-контролем на 2.

Пороговое значение = ОП (диск HSA-контролем) x 2

ОП контрольного диска с HSA > Пороговое значение: положительный результат.

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЯ

Данный метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) позволяет определять концентрации IgE в диапазоне от 0,35 МЕ/мл до 17,5 МЕ/мл. Чтобы определить точную концентрацию IgE в образцах с концентрациями, превышающими 17,5 МЕ/мл, необходимо провести повторный анализ с надлежащим разведением.

ТОЧНОСТЬ (Прецизионность)

Вариабельность и воспроизводимость

1. *Вариабельность в пределах одной серии анализов*

Образец	Среднее [МЕ/мл]	Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	17,45	1,02
2 (n=10)	9,95	8,53
3 (n=12)	13,56	6,05

2. *Вариабельность между сериями анализов*

Образец	Среднее [МЕ/мл]	Коэффициент вариации (%)
1 (n=16)	17,09	3,84
2 (n=22)	13,22	7,00
3 (n=22)	3,84	8,28

ЛИНЕЙНОСТЬ

Анализ 5 произвольно выбранных образцов сыворотки показал линейность ($\leq \pm 20\%$) в условиях трех последовательных разведений. Из-за гетерогенности образцов сыворотки или плазмы человека нельзя исключать возможность получения разных результатов.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

В физиологических концентрациях при проведении данного теста на sIgE перекрестная реактивность с другими классами иммуноглобулинов не наблюдается.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный тест на sIgE имеет следующие ограничения:

- Отрицательный результат теста не исключает аллергию I типа
- Результат теста следует оценивать с учетом клинической картины и анамнеза пациента.

ЛИТЕРАТУРА

Смотрите на стр. 11

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ДЛЯ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ

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 2 (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 производителем, 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 2 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. 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. p-NPP является вредным при проглатывании (H302). Diethanolamin (SubBuf) может вызвать повреждение органов в результате длительного или многократного воздействия (H373). Обратиться за медицинской консультацией / вниманием, если вы плохо себя чувствуете (P314).

16. 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).

17. 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.

18. Настоящим отсылаем вас к национальным нормативам по медицинским изделиям, касающимся наборов для анализов, предназначенных для in-vitro диагностики.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Тел.: +7 (495) 799-1165
E-mail: info@fooke.ru
www.fooke.ru

Specific IgE EAST **REF** 0540200PKL Σ 200 Determinations**BACKGROUND**

The worldwide frequency of allergies has increased significantly over the past decades. The term allergy is often used for Type I hypersensitivity reactions (immediate type reactions), whose symptoms generally occur within 30-60 minutes after contact with the allergen. The most frequent symptoms are: hay fever (rhinitis), conjunctivitis, hives (urticaria), allergic asthma and as the most dangerous manifestation anaphylaxis (the anaphylactic shock). The allergens causing Type I hypersensitivity reactions are mostly proteins derived from the natural environment e.g. plant pollen, animal hair, food, mites, and insect venoms. The characteristics of Type I allergies is the involvement of allergen specific immunoglobulins (antibodies) of class E (sIgE). Hence, the detection of sIgE is an important tool of modern allergy diagnostics.

INTENDED USE

The Specific IgE EAST is intended for the quantitative determination of sIgE in human serum or plasma. The results add to the diagnosis of type I allergies.

PRINCIPLE

The Specific IgE EAST for the quantitative measurement of specific IgE is carried out in microtiterplates. During the first incubation step patient specimens are incubated on allergen coupled discs. Surplus serum components are removed from the well by washing whereas allergen specific IgE remains bound. Subsequently, alkaline phosphatase (AP)-labelled antibody is added forming allergen/sIgE/anti-IgE conjugate complexes. The wells are washed again and the substrate solution p-nitrophenyl-phosphat (pNPP) is added and incubated, resulting in the development of a yellow colour if conjugate is present. After stopping the enzymatic reaction with Sodium hydroxide (NaOH) the optical density (OD) of the coloured reaction product is measured spectro-photometrically at 405 nm (reference wave length 620 nm). The sIgE concentration of the patient sample is proportional to the OD. Calibrators with defined concentrations of IgE (calibrated against WHO 75/502) are assayed simultaneously with the patient samples to generate a calibration curve. Unknown IgE concentrations of the test samples are calculated from this curve.

KIT COMPONENTS

Enzyme kit	0540200PKL
Anti IgE Enzyme-Conjugate	1 x 10,4 mL
Concentrated Washing Buffer (50x)	1 x 30 mL
Substrate Buffer	1 x 50 mL
SubstrateTablets (PNPP)	10 x 5 mg
Stop Solution (1N NaOH)	1 x 10 mL

MATERIAL NEEDED, BUT NOT INCLUDED IN THE KIT

Reference unit	74000PQ	
Anti-IgE Reference discs	2 x 25 discs	
Calibrators 0.35, 0.7, 3.5, 17.5 ME/мл	4 x 0,8 mL	
Allergen discs	Allergen-code	
Controls	07001	07002
Positive Control	1 x 0.5 mL	
Negative Control		1 x 0.5 mL

LABORATORY EQUIPMENT

pipettes 10-100 µL, 200-1000 µL, Multipipette, pipette tips, tubes for dilution of the specimens, graduated glass cylinder, ELISA-Reader, covering foil. microplate-washer, incubator (optionally), lab watch, distilled water.

SPECIMEN COLLECTION & PREPARATION

Either Serum or Plasma can be used in this test. No additives or preservatives are necessary to maintain the integrity of the specimen. Specimens should be stored at 2-8°C and assayed within 48 hours after collection. If the assay cannot be performed within 48 hours or if the specimen has to be shipped, cap the specimen and keep it frozen. Repeated freezing and thawing should be avoided. Frozen specimens should be thawed at room temperature (RT, 20-25°C) and mixed thoroughly by gentle inversion before assaying. Samples should be tested undiluted. The use of haemolysed or lipemic specimens is not recommended.

PREPARATION OF REAGENTS

Allow all reagents to come to RT before use.

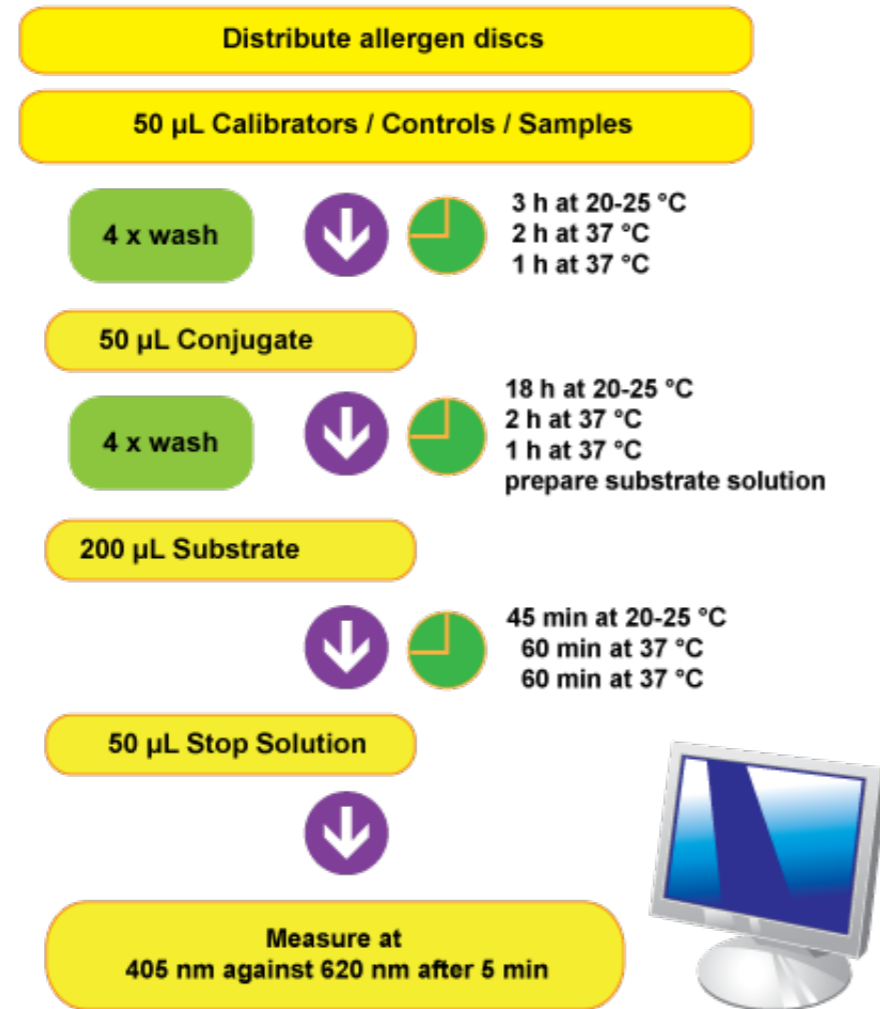
Enzyme conjugate: ready to use
Calibrators and Controls: ready to use
Substrate solution: to be prepared freshly
Stop solution: ready to use
Concentrated Washing Buffer: the concentrated Washing Buffer has to be diluted 1:50 in distilled water. (Example: For 2 strips 10 mL of Washing Buffer is required. Therefore 200 µL concentrated Wash-ing Buffer have to be diluted to a final volume of 10 mL with distilled water.). The resulting Washing Buffer is stable for one week at RT.

ASSAY PROCEDURE

1. Prepare a protocol for the assay run. It is recommended to test the calibrators and controls in duplicate determination.
2. Using plastic forceps, put reference and allergen discs into test wells on the plate according to your protocol.
3. Pipette exactly 50 µL calibrator, control and patient samples directly onto the respective disc. Cover plate and incubate according to Table 1.
4. Following completion of the incubation time wash each well of the plate with an appropriate ELISA plate washer 4 x 1000 µL in "overflow"-modus with diluted Washing Buffer.
5. Pipette exactly 50 µL Anti-IgE-Conjugate onto each disc. Cover plate and incubate according to Table 1.
6. Prepare substrate solution approximately 1 h before use and store in the dark until use. Use one tablet for 5 mL Substrate Buffer.
7. Repeat washing as described in step 4.
8. Pipette 200 µL substrate solution into each well and incubate according to Table 1.
9. Add 50 µL stop solution to each well in the same order and interval as used for the substrate solution. It is recommended to mix the colour solution in the wells by knocking on the frame. Incubate plate for 5 min at RT. Read OD at 405 nm in a microplate reader (reference wave-length 620 nm) and calculate the results of the samples and controls as described on page 10.

Table 1: Incubation scheme

	Assay description		
	Long-time	Short-time	Abbreviated
Serum-incubation	3 h RT	2 h 37 °C	1 h 37 °C
Conjugate-incubation	18 h RT	2 h 37 °C	1 h 37 °C
Substrate-incubation	45 min RT	1 h 37 °C	1 h 37 °C

TEST SCHEME Specific IgE EAST**CALCULATION OF RESULTS**

It is recommended to use validated software for the calculation of the results. For manual calculation, the mean OD [Δ 405 nm – 620 nm] values are calculated from the calibrators and controls. Generate a graph from the mean OD values of the four calibrators on half logarithmic paper (Abscissa: log IU IgE/mL; Ordinate: linear OD Δ 405 nm – 620 nm) to create a standard curve. The sIgE concentration of the patient sample is determined on the basis of this standard curve. The OD is mapped on the Ordinate and the result in IU/mL can be read out on the Abscissa. The standard curve and the controls should be in the acceptance range given in the Quality-Control-Certificates delivered with the kit. Otherwise, the test conditions should be verified and the test should probably be repeated. RAST-classes are determined by means of the concentration as follows and the results are interpreted accordingly:

Class	IU/mL sIgE	Interpretation
4	> 17.5	very high
3	3.50 - 17.50	high
2	0.70 - 3.50	moderate
1	0.35 - 0.70	low
0	< 0.35	non detectable

EXPECTED VALUES

The clinical relevance of a positive test result varies significantly among the different allergens. Therefore, it is highly recommended for each laboratory to determine the normal range for each allergen individually. The above listed values can be used as a guideline for the interpretation.

HSA coupled allergens

molecular substances (Haptens) e.g. Penicillin and Isocyanates, are coupled to the discs by a protein

(Human Serum Albumin / HSA). In rare cases patient samples can contain HSA specific IgE. Therefore reaction against HSA itself has to be tested for each patient sample by running the HSA-Control Disc test and comparing the results to the Allergen-HSA-Conjugate.

Recommended interpretation:

The sIgE concentration against the HSA Conjugate is measured in parallel to sIgE to HSA. The concentration obtained from the HSA disc has to be subtracted from the concentration obtained from the respective HSA conjugate.

Alternative interpretation:

The result for the Allergen-HSA-Conjugate is calculated by multiplying the OD-Value of the HSA Control Disc by the factor 2.

$$\text{Cut off} = \text{OD (HSA control disc)} \times 2$$

OD Allergen-HSA-Conjugate > Cut off: positive result.

MEASURING RANGE

This ELISA detects IgE concentrations in the range between 0.35 and 17.5 IU/mL. Samples with IgE concentrations above 17.5 IU/mL should be diluted and retested to obtain the exact concentration.

PRECISION

Variability and Reproducibility

1. Intra-Assay-Variability

Specimen	Mean [IU/mL]	CV (%)
1 (n=10)	17,45	1,02
2 (n=10)	9,95	8,53
3 (n=12)	13,56	6,05

2. Inter-Assay-Variability

Specimen	Mean [IU/mL]	CV (%)
1 (n=16)	17,09	3,84
2 (n=22)	13,22	7,00
3 (n=22)	3,84	8,28

LINEARITY

Five randomly selected sera show a linear behaviour ($\leq \pm 20\%$) in three consecutive dilution steps. Based on the heterogeneity of human serum- or plasma samples varying results can not be excluded.

SPECIFICITY

In physiological concentrations no cross-reactivity to other Ig-classes could be observed using this sIgE test.

LIMITATIONS OF THE METHOD

This sIgE test shows the following limitations:

- A negative test result does not exclude a Type I allergy
- The test result has to be considered in the context of the patient's history and the clinical findings

LITERATURE

1. Ishizaka K, Ishizaka T, und Hornbrook MM: Physicochemical Properties of Human Reaginic Antibody IV. Presence of a Unique Immunoglobulin as a Carrier of Reaginic Activity J Immunol 1966, 97:75-85.
2. Hamilton R: Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease, Ligand Quarterly 1979, 2:13-19.
3. Johansson S, Bennich H, Berg T: The Clinical Significance of IgE, Progress in Clin. Immunol 1972, 1.
4. Kjellman M: Immunoglobulin IgE and Atopic Allergy in Childhood. Linkpoing University Medical Dissertations No 36 1976.
5. Wittig H, Bellot J, Fillippi I, Royal G: Age-related Serum IgE Levels in Healthy Subjects and in Patients with Allergic Disease. J Allergy Clin Immunol 1980, 66:305-313.
6. Gleich, G., Averbeck, A., and Swedlund, H.: Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay. J Lab and Clin Med 77 (1971) 690-698.

PRECAUTIONS FOR USERS

1. In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of in-vitro diagnostic medical devices is intended to secure suitability, performance and safety of the product by the manufacturer. Therefore the test procedure, information, precautions and warnings stated in the instructions for use have to be followed strictly. The kit has only to be used as described on page 1 (intended use).
2. The test must be performed according to this instruction, which contains all necessary information, precautions and warnings. The use of the test kit with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition of the test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes resulting in false results and other incidents. The manufacturer is not liable for any results obtained by visual analysis of patient samples.
3. The kit is intended for use by trained and qualified professionals carrying out research or diagnostic activities only. Pregnant women should not perform the test.
4. Laboratory equipment has to be maintained according to the manufacturer's instructions and must be tested for its correct function before use.
5. For in-vitro diagnostic use only. Use only once. Do not use components exceeding the expiry date. Do not combine reagents of other suppliers or kit components of different lots (unless specified on page 8) with this kit.
6. Do not use kit components when the package of the component is damaged. Please check all solutions prior to use for microbiological contamination. Cap vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbiological contamination. Do not interchange screw caps of the reagent vials.
7. The kit was evaluated for use at the temperatures specified in the Testing scheme (see page 9). Higher or lower temperatures may result in values not meeting the quality control ranges.
8. The washing procedure is absolutely important. Improper washing will cause erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette and an automated washer.
9. To avoid cross-contamination and false-positive results it is recommended to perform all pipetting steps properly. Use only clean pipette tips, dispensers and lab ware.
10. Test components based on human serum were tested using a CE marked method for the presence of antibodies against HIV 1 / HIV 2, Anti-HBc, and Anti-HCV as well as for hepatitis antigen HBsAg and were found to be negative. Nevertheless, material based on human serum should be handled as potentially infectious (BIOHAZARD).
11. Some kit components may contain bovine serum albumin, of which according to the manufacturer no infectious potential is known. Due to the eventual occurrence of undetectable infectious agents we recommend to handle any product of animal origin as potentially infectious.
12. The following safety rules should be followed with all reagents:
 - Do not get in eyes, on skin, or on clothing (P262). Do not breathe spray (P260). Pipetting should never be done by mouth, but with suitable pipetting devices.
 - IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting (P301/330/331)
 - IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower (P303/361/353).
 - IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing (P303/340).
 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. (P305/351/338)
 - Don't eat, drink or smoke while performing the test. Keep away from food, feed and beverage.
 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection (P280). Wash hands thoroughly after handling (P264) and care for your skin.
 - Material safety data sheet is available on request.
13. Stop Solution and SubBuf cause severe skin burns and eye damage (H314).
14. TMB in high concentrations may be potentially mutagenic. Due to the low concentration of TMB in this substrate solution a mutagenic effect can be ruled out, if it is properly used.
15. p-NPP is harmful if swallowed (H302). Diethanolamin (SubBuf) may cause damage to organs through prolonged or repeated exposure (H373). Get medical advice/attention if you feel unwell (P314).
16. The preservatives (Bronidox) are toxic to aquatic life, but their concentration is not hazardous to environment anymore. On disposal, flush large volumes of reagents with plenty of water.

16. The preservatives (Bronidox) are toxic to aquatic life, but their concentration is not hazardous to environment anymore. On disposal, flush large volumes of reagents with plenty of water.
17. Waste containing serum must be collected in separate containers containing an appropriate disinfectant in sufficient concentration. This material has to be treated according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
18. We refer to the national regulations of medical devices regarding in-vitro diagnostic test kits.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Тел.: +7 (495) 799-1165
E-mail: info@fooke.ru
www.fooke.ru