

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

## **Specific IgE REAST**

Reversed Enzyme Immuno Assay  
for the quantitative determination  
of specific IgE in human Serum or Plasma  
with Biotinylated Allergens

**С БИОТИНИЛИРОВАННЫМИ ЖИДКОФАЗНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ  
АЛЛЕРГЕНОВ, РЕКОМБИНАНТНЫМИ И ВЫСОКО ОЧИЩЕННЫМИ  
НАТИВНЫМИ АЛЛЕРГЕНАМИ**

Номер по каталогу  0520960FL  96 определений

Номер по каталогу  0524800FL  480 определений

Для *ин витро* диагностики  
Регистрационное Удостоверение  
№ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015г.



## 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 своём являются белками природного происхождения, например, пыльца растений, волосяной покров животных (эпидермис), пищевые продукты, клещи и яды насекомых.

Характерной особенностью аллергии I типа является участие аллерген-специфических иммуноглобулинов (антител) класса E (IgE). Для измерения IgE в аллергодиагностике I типа используются экстракты аллергенов, содержащие соответствующие главные и второстепенные аллергены, а также неаллергические компоненты. Эти экстракты подходят для первого скринингового тестирования пациентов и в настоящее время дополняются рекомбинантными или высоко очищенными нативными аллергенами. Поэтому выявление IgE является важным средством современной диагностики аллергии.

## НАЗНАЧЕНИЕ

Specific IgE REAST предназначен для количественного определения аллерген-специфических IgE в сыворотке или плазме крови человека в клинических, диагностических и научно-исследовательских лабораториях. Результаты учитываются при диагностике аллергии I типа.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Метод определения основан на трехстадийном «сэндвич» - варианте твердофазного иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к IgE. На этапе первой инкубации все IgE-антитела, присутствующие в сыворотке пациента, связываются с анти-IgE-антителами, которыми сорбированы ячейки планшета. Несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляются промывкой, тогда как IgE-антитела остаются связанными с твердой фазой. На этапе следующей инкубации добавляют биотинилированный аллерген и инкубируют в ячейках планшета. После следующего этапа промывки проводят детектирование связанного аллергена, используя конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена, образующий комплексы из специфического IgE/биотинилированного аллергена/конъюгата с пероксидазой хрена. Лунки снова промывают, добавляют раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидинового ТБМ субстрата и инкубируют с получением в итоге синего цвета. Ферментная реакция останавливается добавлением кислоты, цвет меняется на желтый. Оптическую плотность (OD) окрасившегося продукта измеряют спектрофотометрически на длине волны 450 нм (эталонная длина волны 620 нм). Концентрация IgE в образце пациента пропорциональна оптической плотности. Калиброванные стандарты с известным содержанием IgE-специфических антител (калиброванные по Международному 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

Реагенты	REF № 0520960FL	REF № 0524800F
Планшет разборный (12 x 8 стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности антителами к IgE, готов к использованию	1 планшет	5 планшет
Стрептавидин-HRP конъюгат	1 флакон x 16 мл	1 флакон x 55 мл
25-кратный концентрат фосфатно-солевого промывочного буферного раствора	1 флакон x 50 мл	1 флакон x 110 мл
Раствор субстрата ТБМ	1 флакон x 16 мл	1 флакон x 55 мл
Стоп-раствор (0,5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 флакон x 16 мл	1 флакон x 55 мл

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

### 1. Набор калибраторов

Анти-IgE биотин конъюгат  
Калибраторы (0.35, 0.7, 3.5, 17.5, 50, 100 МЕ/мл)

### REF № 07050FL

1 флакон x 10 мл  
6 флаконов x 1.5 мл

### 2. Биотинилированные аллергены

Экстракты аллергенов  
Рекомбинантные или нативные аллергены

### REF Каталожный № аллергена

1 флакон x 2.8 мл  
1 флакон x 2.8 мл

### 3. Контроли

Положительный контроль  
Отрицательный контроль

### REF № 07005 / №07006

1 флакон x 1.0 мл  
1 флакон x 1.0 мл

## 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 (промывочное устройство).

## 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 одной недели. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить. Следует избегать повторного замораживания и размораживания образцов. Замороженные образцы следует размораживать при комнатной температуре (комнатная температура, 20-25°C) и тщательно перемешать осторожным переворачиванием пробирки, перед началом анализом. Не рекомендуется использовать гемолизированные или липемические образцы.

## ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Все реагенты перед использованием довести до комнатной температуры. Не востребованные микротитрационные стрипы герметично упаковать в имеющийся пакет из фольги с осушителем.

Раствор субстрата:                   готов к применению;  
Стоп-раствор:                         готов к применению;  
Стандарты и контроли:             готовы к применению;  
Конъюгат:                             готов к применению;  
Анти-IgE-биотин:                   готов к применению;  
Промывочный раствор:             концентрированный промывочный раствор нужно развести дистиллированной водой в соотношении 1:25 **Пример:** для 2 стрипов потребуется 50 мл промывочного раствора. Следовательно 2 мл концентрированного промывочного буфера нужно развести дистиллированной водой до получения конечного объема 50 мл). Полученный таким образом промывочный буфер можно использовать в течение одной недели при комнатной температуре.

## ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Создайте схему пипетирования. Настоятельно рекомендуется анализировать стандарты, контроли и исследуемые образцы пациентов в дублях.
2. Установите необходимое количество стрипов в рамку. Оставшиеся неиспользованные стрипы, тщательно герметично упакуйте в имеющийся пакет из фольги с осушителем.
3. С помощью пипетки внесите 50 мкл неразведённых калибровочных стандартов, контролей и образцов пациента в соответствующие лунки.

## ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- В этом шаге добавляем в лунки с положительным и отрицательным контролями аллерген d1-FL, относительно которого стандартизированы контроли.
- Накройте планшет и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (20-25°C).
- Промойте планшет вручную или используйте для этой цели промывочное устройство вошер с функцией (**overflow**) 3 раза, каждый раз используя 500 мкл промывочного буфера на каждую лунку. После завершения третьего цикла удалите остатки жидкости, промокнув микропланшет бумажным полотенцем.
- Добавьте 100 мкл соответствующих биотинилированных аллергенов (для образцов пациента и контролей) и конъюгат анти-IgE Биотин (для стандартов), следуя схеме пипетирования, накройте планшет и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре.

## СМЕХА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

### Ручная обработка

50 мкл Калибраторов / Контролей / Образцов (неразбавленных)

3-х кратная промывка



60 мин. при ком. температуре

100 мкл Биотинилированных аллергенов / Анти-IgE Биотин

3-х кратная промывка



60 мин. при ком. температуре

100 мкл Конъюгат HRP

3-х кратная промывка



30 мин. при ком. температуре

100 мкл TMB Субстрат



30 мин. при ком. температуре в темноте

100 мкл Стоп-раствор



Измерить 450 нм / 620 нм через 5 мин



### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения средней оптической плотности (ОП) [ $\Delta$  450 нм – 620 нм] рассчитывают по калибровочным стандартам, контролям и образцам пациента.

На полулогарифмической бумаге постройте график по средним значениям оптической плотности, полученным для шести калибровочных стандартов (Абсцисса:  $\log$  IgE МЕ/мл; ордината: линейная оптическая плотность  $\Delta$  450 нм - 620 нм).

Концентрацию специфических IgE в образце пациента определяют по стандартной кривой. Среднюю оптическую плотность указывают на оси ординат, и результат в МЕ/мл можно прочитать на абсциссе.

Значения калибровочной кривой и контролей должны соответствовать диапазону приемлемых значений, указанному в Сертификатах контроля качества, которые поставляются вместе с набором. Если стандартная кривая или контроли не соответствуют паспортным значениям, следует проверить условия проведения анализа и, вероятно, повторить анализ.

## ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Концентрация калибровочного стандарта (МЕ/мл)	ОП 450 нм Среднее (n=22)	Диапазон приемлемых значений ОП 450 нм
100.0	3.015	2.111 - 3.920
50.0	2.558	1.791 - 3.325
17.5	1.619	1.133 - 2.105
3.5	1,619	0.398 - 0.738
0.7	0.161	0.113 - 0.209
0.35	0.106	0.074 - 0.138

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По калибровочной кривой рассчитывают концентрации специфических IgE в образцах, выражая их как классы REAST (реверсивного аллергосорбентного теста) или в международных единицах на мл (МЕ/мл), и оценивают следующим образом:

Класс	МЕ/мл	Концентрация специфических IgE
6	> 100	чрезвычайно высокий уровень
5	50 - 100	очень сильно высокий уровень
4	17.5 - 50	очень высокий уровень
3	3.5 - 17.5	высокий уровень
2	0.7 - 3.5	средний уровень
1	0.35 - 0.7	низкий уровень
0	< 0.35	не поддается обнаружению

## ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая значимость положительного результата анализа сильно варьирует среди отдельных аллергенов. Поэтому рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определила собственные ожидаемые значения для конкретных популяций за определённый период времени и в статистически значимом количестве анализов, прежде чем установить клиническую значимость результатов. Приведенные ниже значения можно использовать в качестве ориентировочных при оценке собственных результатов.

## ИЗМЕРЯЕМЫЙ ДИАПАЗОН

Концентрация специфических IgE может быть определена в диапазоне от 0,35 МЕ/мл до 100 МЕ/мл. Образцы с более высокими концентрациями специфических IgE следует разбавить и проанализировать повторно, для определения точной концентрации специфических IgE.

## ТОЧНОСТЬ

### Вариабельность и воспроизводимость

#### 1. Результаты в пределах одного анализа

Образец	Значение МЕ/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	8.6	2.0
2 (n=7)	94.6	6.6

#### 2. Результаты разных анализов

Образец	Значение МЕ/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=20)	8.5	3.8
2 (n=16)	95.8	6.7

## ЛИНЕЙНОСТЬ

Анализ 5 образцов сыворотки у произвольно выбранных пациентов показал линейность в условиях трех последовательных разведений ( $< \pm 20\%$ ). Из-за гетерогенности образцов сыворотки или плазмы человека возможно получение разных результатов.

## СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Реверсивный аллергосорбентный тест на специфические IgE (Specific IgE REAST) определяет молекулы специфических IgE в человеческой сыворотке или плазме. При физиологических концентрациях перекрёстная реактивность с другими иммуноглобулинами, такими как IgA, IgD, IgM и IgG, не наблюдается.

## ОГРАНИЧЕНИЕ МЕТОДА

Реверсивный аллергосорбентный тест на специфические IgE (Specific IgE REAST) имеет следующие ограничения: Отрицательный результат теста не исключает аллергию I типа; Результат теста следует оценивать с учетом анамнеза пациент; В анализируемых образцах с высоким уровнем содержания общего IgE ( $> 1000$  МЕ/мл) измененные концентрации sIgE могут быть ниже реальных значений; При использовании смесей (микстов) аллергенов возможно лишь полуколичественное определение.

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 завинчивающиеся крышки флаконов с реагентами.
7. Набор прошел оценку для использования при температурах, указанных в Схеме проведения анализа (смотрите страницу 4). 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).

12. В отношении всех реагентов необходимо соблюдать следующие правила безопасности:
- **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 тяжёлые 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.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Johansson S, Bennich H and Berg T: The Clinical Significance of IgE. Progress in Clin Immunol, 1972, 1.
2. Kjellman M: Immunoglobulin IgE and Atopic Allergy in Childhood. Linköping University Medical Dissertations No 36 (1976).
3. Kleine-Tebbe J, Breuer K, Lepp U, Vieths S, Worm M, Kunkel G, Wahn U und Lau S: Spezifische IgE-Werte gegen Aero- und Nahrungsmittelallergene im Vergleich: Dr. Focke ALLERG-O-LIQ und Pharmacia CAP-System. Allergologie 2004, 4:129-134.
4. Arbeitsgruppe der Deutschen Diagnostika Gruppe e.V. (DDG): Gute Labordiagnostische Praxis GLDP, Konzept einer „Guten Labordiagnostischen Praxis“. Clin Lab 1999, 45:569-580.
5. Sun B, Mahler M, Mei J, Jing L, Zhong N: Allergen-specific IgE to inhalant and food allergens and total IgE values in China – Comparison between two commercial immunoassays: Dr. Focke ALLERG-O-LIQ versus Phadia ImmunoCAP® System. J Invest All Clin Immunol 2008, 18:319-321.