

ИНСТРУКЦИЯ

Тест–система для количественного определения аллерген–специфических IgE в сыворотке или плазме человека с применением жидких биотинилированных аллергенов

Реверсивный аллергосорбентный тест («capture» REAST)

для диагностики *in vitro*

Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015 г.





DR FOOKE

Тел.: +7 (495) 799-11-65

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 REAST  0520960FL  96 Определений
 Specific IgE REAST  0524800FL  480 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, волосяной покров животных (эпидермис), 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

Реверсивный аллергосорбентный тест на специфические IgE (Specific IgE REAST) предназначен для количественного определения sIgE в сыворотке или плазме человека. Результаты учитываются при диагностике аллергии I типа.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Реверсивный аллергосорбентный тест на специфические IgE (Specific IgE REAST), предназначенный для количественного определения IgE, основывается на методе иммуноферментного анализа «сэндвич-вариант». 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 25% фосфорной кислоты, цвет меняется на желтый. Оптическую плотность (ОП) окрасившегося продукта измеряют спектрофотометрически на длине волны 450 нм (эталонная длина волны 620 нм). Концентрация sIgE 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. Незвестные концентрации IgE в анализируемых образцах рассчитывают по данной кривой.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Компоненты набора	Каталожные № 0520960FL / №0524800FL
Стрипы с иммобилизованными моноклональными антителами к IgE человека	1 планшет / 5 планшет
Streptavidin-HRP конъюгат	1 x 16 мл / 1 x 55 мл
Промывочный буфер, концентрат 25x	1 x 50 мл / 1 x 110 мл
Раствор субстрата ТМБ	1 x 16 мл / 1 x 55 мл
Стоп-раствор 25% H3PO4	1 x 16 мл / 1 x 55 мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Набор калибраторов	Каталожный №7050FL
Флакон анти-IgE-биотин	1 x 10 мл
Калибраторы (0.35, 0.7, 3.5, 17.5, 50, 100 МЕ/мл)	6 x 1.5 мл
Биотинилированные аллергены	Код аллергена + FL
Контроли	Каталожные № 7005 / №07006
Положительный контроль	1 x 1.0 мл
Отрицательный контроль	1 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, планка 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 неразведенных калибровочных стандартов, контролей и образцов пациента в соответствующие лунки.
4. В лунки с положительным и отрицательным контролями в этом шаге добавляем биотинилированный аллерген d1-FL, относительно которого стандартизированы контроли.
5. Накройте планшет и инкубируйте 60 минут при комнатной температуре (20–25°C).
6. Промойте планшет вручную или используйте для этой цели промывочное устройство вошер с функцией (overflow) 3 раза, каждый раз используя 500 мкл промывочного буфера на лунку. После завершения третьего цикла удалите остатки жидкости, промокнув микропланшет бумажным полотенцем.
7. 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.
8. Повторите процедуру промывки, как описано в пункте 5.

9. Добавьте 100 мкл конъюгата стрептавидин–пероксидаза в каждую лунку, накройте микропланшет и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.
10. Повторите процедуру промывки, как описано в пункте 5.
11. Добавьте 100 мкл субстрата ТБМ в каждую лунку, накройте планшет и инкубируйте в темноте 30 минут при комнатной температуре.
12. После инкубации добавьте 100 мкл стоп–раствора в каждую лунку в том же порядке, что и субстрат. Рекомендуется перемешать раствор в лунках, осторожным постукиванием по рамке. Через 5 минут определить оптическую плотность образцов на длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм), используя микропланшетный ридер, и рассчитайте концентрации специфических IgE–антител в контролях и образцах, как описано ниже.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Ручная обработка



ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значения средней оптической плотности (ОП) [Δ 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 Δ 450 нм – 620 нм). Концентрацию sIgE 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
0,35	0,106	0,074 – 0,138
0,7	0,161	0,113 – 0,209
3,5	0,568	0,398 – 0,738
17,5	1,619	1,133 – 2,105
50,0	2,558	1,791 – 3,325
100,0	3,015	2,111 – 3,920

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По калибровочной кривой рассчитывают концентрации sIgE 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 определенный 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 sIgE следует разбавить и проанализировать повторно, для определения точной концентрации sIgE.

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость

Образец	1. внутри одной серии		2. между сериями	
	Значение МЕ/мл	Коэффициент вариации (%)	Образец	Значение МЕ/мл / Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	8.6	2.0	1 (n=20)	8.5 / 3.8
2 (n=7)	94.6	6.6	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 sIgE в человеческой сыворотке или плазме. При физиологических концентрациях перекрёстная реактивность с другими иммуноглобулинами, такими как IgA, IgD, IgM и IgG, не обладает.

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 пациента
- 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.

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 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 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 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/душом (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.

REF	0520960FL	∇	96 Determinations
REF	0524800FL	∇	480 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 min 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 REAST 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 REAST for the quantitative measurement of IgE is based on a Sandwich ELISA. During the first incubation step total IgE from the patient sample is captured by anti-human IgE coated to the microwells. By a washing procedure surplus serum components are removed from the well whereas IgE remains bound to the solid phase surface. During the next incubation step biotinylated allergen is added and incubated in the microwells. After a further washing step detection of bound allergen is carried out with a streptavidin/peroxidase (HRP)–conjugate forming complexes consisting of specific IgE/biotinylated allergen/HRP–conjugate.

The wells are washed again, and the substrate solution 3,3',5,5'–Tetra–Methyl–Ben–zidine (TMB) is added and incubated, resulting in the development of a blue colour. After stopping the enzymatic reaction with acid the colour changes into yellow. The optical density (OD) of the coloured product is measured spectrophotometrically at 450 nm (reference wave length 620 nm). The sIgE concentration of the patient sample is proportional to the optical density. 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	Ref № 0520960FL / №0524800FL
Microtiterstrips, anti-IgE coated	1 Plate / 5 Plate
Streptavidin HRP–Conjugate	1 x 16 mL / 1 x 55 mL
Washing Buffer Concentrate (25x)	1 x 50 mL / 1 x 110 mL
TMB Substrate	1 x 16 mL / 1 x 55 mL
Stop Solution 25% H3PO4	1 x 16 mL / 1 x 55 mL

MATERIAL NEEDED BUT NOT INCLUDED IN THIS KIT

Reference unit	Ref № 07050FL
Anti-IgE Biotin conjugate	1 x 10 mL
Calibrators (0.35, 0.7, 3.5, 17.5, 50, 100 IU/mL)	6 x 1.5 mL
Biotinylated allergens	Allergen code + FL
Controls	Ref № 7005 / №07006
Positive Control	1 x 1.0 mL
Negative Control	1 x 1.0 mL

OTHERS

10–100 µL and 200–1000 µL pipettes, Multipette, pipette tips, vials for diluting the specimen, graduated glass cylinder, microplate–reader, covering foil, microplate–washer (optional), 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.

At 2–8°C specimens are stable for one week. By lengthy storage specimens need to get 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. The use of haemolysed or lipemic specimens is not recommended.

PREPARATION OF REAGENTS

Allow all reagents to come to room temperature before use. Microtiterstrips which are not required have to be resealed properly in the provided foil bag containing a desiccant.

Substrate Solution: ready to use

Stop Solution: ready to use

Calibrators and Controls: ready to use

Enzyme conjugate: ready to use

Anti IgE Biotin ready to use

Concentrated Washing Buffer: The concentrated Washing Buffer has to be diluted 1:25 in distilled water (Example: 2 strips will require 50 mL of Washing Buffer. Therefore 2 mL concentrated Washing Buffer have to be diluted to a final volume of 50 mL with distilled water). The resulting Washing Buffer is useable for one week at RT.

ASSAY PROCEDURE

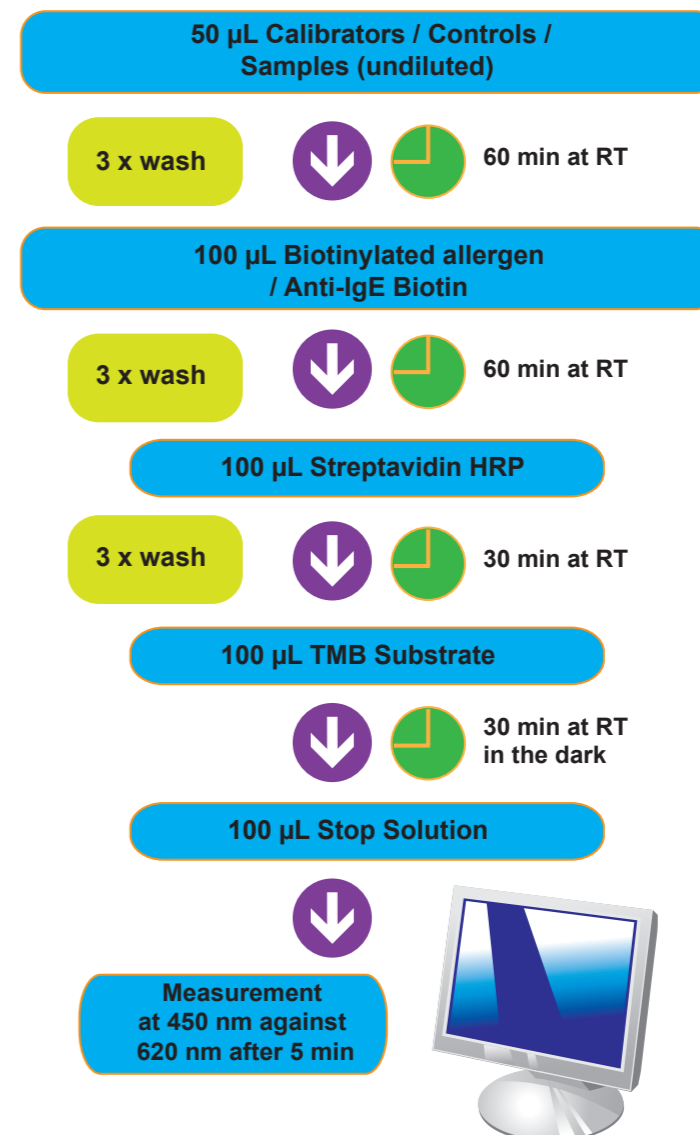
1. Create a pipetting schedule. It is highly recommended to test the Calibrators and Controls as well as all patient samples in duplicate.
2. Place the required coated wells into a frame and reseal the aluminium bag with the remaining strips and desiccant properly.
3. Pipette 50 µL of undiluted calibrators, controls and patient samples into their respective wells.
4. Cover plate and incubate for 60 min at RT (20–25°C).
5. Wash the plate manually or with an appropriate ELISA plate washer (overflow) 3 times each with 500 µL washing buffer per well. Remove residual liquid by dunking the microplate onto a paper towel.
6. Add 100 µL of the respective allergen solution (for patients and controls) and of the anti-IgE Biotin conjugate (for standards) according to the pipetting scheme, cover plate and incubate for 60 min at RT.
7. Repeat washing procedure as described in step 5.
8. Pipette 100 µL of Streptavidin HRP conjugate into each well, cover the microplate and incubate for 30 min at RT.
9. Repeat washing procedure as described in step 5.
10. Add 100 µL of TMB Substrate to each well, cover the plate and incubate for 30 min at RT in the dark.
11. Pipette 100 µL of Stop Solution in the same order as the substrate to each well. It is recommended to mix the solution in the wells by carefully knocking on the frame. Read OD values after 5 min at 450 nm (reference wave length 620 nm) using an appropriate microplate reader and calculate the concentrations of controls and samples as described on page 9.

CALCULATION OF RESULTS

The average optical density (OD) [$\Delta 450 \text{ nm} - 620 \text{ nm}$] values are calculated from the calibrators, controls and patient samples. Generate a graph from the average OD values of the six calibrators on half logarithmic paper (Abscissa: log IU IgE/mL; Ordinate: linear optical density $\Delta 450 \text{ nm} - 620 \text{ nm}$). The sIgE concentration of the patient sample is determined on the basis of the standard curve. The average optical density is mapped on the Ordinate and the result in IU/mL can be read out on the Abscissa. The calibrator 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.

TEST SCHEME SPECIFIC IgE REAST

Manual Processing



Device-specific settings apply for fully automated processing.

EXAMPLE CALIBRATOR CURVE

Calibrator Concentration (IU/mL)	OD 450 nm Mean (n=22)	Acceptance range OD 450 nm
0,35	0,106	0,074 – 0,138
0,7	0,161	0,113 – 0,209
3,5	0,568	0,398 – 0,738
17,5	1,619	1,133 – 2,105
50,0	2,558	1,791 – 3,325
100,0	3,015	2,111 – 3,920

EVALUATION OF THE RESULTS

Using the calibration curve the sIgE concentrations of samples are calculated either in REAST– Classes and/or in international units per millilitre (IU/mL) and evaluated as follows:

Class	IU/mLspec.	IgE concentr.
6	> 100	extremely positive
5	50 – 100	very strong positive
4	17.5 – 50	strong positive
3	3.5 – 17.5	clearly positive
2	0.7 – 3.5	moderate
1	0.35 – 0.7	low
0	< 0.35	not detectable

RESULTS TO BE EXPECTED

The clinical relevance of a positive test report varies significantly between individual allergens. Therefore, it is recommended, that expected values for given populations should be determined by each laboratory over a period of time and in a statistically significant number of assays before clinical significance is attached to the results of the assay. The values given below can be used as a guideline for the own results.

MEASURING RANGE

This ELISA detects sIgE concentrations between 0.35 IU/mL and 100 IU/mL. Specimens with higher sIgE concentrations should be diluted and retested to determine the exact sIgE content.

PRECISION

Variability and Reproducibility

1. Intra-Assay Variability

Specimen	Mean IU/mL	CV (%)
1 (n=10)	8.6	2.0
2 (n=7)	94.6	6.6

2. Inter-Assay Variability

Specimen	Mean IU/mL	CV (%)
1 (n=20)	8.5	3.8
2 (n=16)	95.8	6.7

LINEARITY

5 randomly selected patient sera displayed a linear behaviour in three consecutive dilution steps (< ±20%). Due to the heterogeneity of human serum or plasma samples different results may be possible.

SPECIFICITY

The Specific IgE REAST specifically detects human sIgE molecules. In physiological concentrations cross-reactivity to other Immunoglobulins such as IgA, IgD, IgM and IgG has not been observed.

LIMITATION OF THE METHOD

The Specific IgE REAST has 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
- For test samples with high amount of total IgE (> 1000 IU/mL) the measured concentrations of sIgE may be lower than the effective values
- By using allergen mixtures only a semi-quantitative determination is possible

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 7) 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 (BIOHAZ-ARD).
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 causes 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. The preservatives (Bronidix, Thimerosal, Azid) 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. Thimerosal (WashBuf B) may cause damage to organs through prolonged or repeated exposure(H373)
16. 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.
17. We refer to the national regulations of medical devices regarding in-vitro diagnostic test kits.

LITERATURE

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.