

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

## **Specific IgE EAST**

Enzym Allergo Sorbent Test  
for the quantitative determination  
of allergen-specific IgE in human serum or plasma  
with allergen coated discs

### **С ПРИМЕНЕНИЕМ АЛЛЕРГОДИСКОВ**

Все стадии исследования проводятся в ячейках плоскодонного планшета,  
в который распределяют аллергодиски.

Номер по каталогу **REF 0540200PKL**  200 определений

Номер по каталогу **REF 0541000PKL**  1000 определений

Для *in vitro* 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 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 (IgE). Поэтому выявление IgE является важным средством современной диагностики аллергии.

## НАЗНАЧЕНИЕ

Ферментативный аллержосорбентный 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 аллержосорбентный 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

### Реагенты

Анти IgE ферментативный конъюгат  
Концентрированный буфер для промывки (50x)  
Субстратный буфер  
Стоп-раствор (1N NaOH)  
Таблетки субстрата (PNPP)

### REF № 0540200PKL

1 флакон x 10,4 мл  
1 флакон x 30 мл  
1 флакон x 50 мл  
1 флакон x 10 мл  
10 шт x 5 мг

### REF № 0541000PKL

1 флакон x 52 мл  
1 флакон x 160 мл  
1 флакон x 250 мл  
1 флакон x 52 мл  
50 шт x 5 мг

## НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НО НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

### 1. Набор калибраторов

Эталонные диски с антителами к IgE  
Калибровочные стандарты 0.35, 0.7, 3.5, 17.5 ME/мл

### REF № 74000PQ

2 кассеты x 25 дисков  
4 флакона x 0,8 мл

### 2. Аллергодиски

Экстракты моно аллергенов  
Экстракты микстов аллергенов

### REF Каталожный № аллергена

1 кассета x 5; 10; 25 дисков  
1 кассета x 5; 10; 25 дисков

### 3. Контроли

Положительный контроль  
Отрицательный контроль

### REF № 07001 / №07002

1 флакон x 0,5 мл  
1 флакон 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.

<b>Конъюгат с ферментом:</b>	готов к использованию
<b>Калибровочные стандарты и контроли:</b>	готовы к использованию
<b>Субстратный буфер:</b>	требуется свежеприготовленный
<b>Стоп-раствор:</b>	готов к применению
<b>Концентрированный промывочный буфер:</b>	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 рекомендуется 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) четыре 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.

Распределить аллергодиски

50 мкл Калибровочных стандартов / Контролей / Образцов

4-х кратная промывка



3 часа при 20-25°C  
2 часа при 37°C  
1 час при 37°C

50 мкл Конъюгата

4-х кратная промывка



18 часов при 20-25°C  
2 часа при 37°C  
1 час при 37°C  
Подготовить раствор субстрата

200 мкл Субстрат ТМБ



45 минут при 20-25°C  
60 минут при 37°C  
60 минут при 37°C

50 мкл Стоп-раствора



Считывания результатов через 5 минут, на длине волны 405 нм, в сравнении с длиной волны 620 нм



Таблица №1: Схема инкубации  
Описание анализа

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

КТ = комнатная температура

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 полупрологарифмической 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 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 образом:

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

### Вариабельность и воспроизводимость

#### 1. Результаты в пределах одной серии анализов

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

#### 2. Результаты между сериями анализов

Образец	Значение МЕ/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=16)	17,09	3,84
2 (n=22)	13,22	7,00
2 (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.

## ОГРАНИЧЕНИЕ 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

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. Linköping 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.

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 CE 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.