

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА Е
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ
C.A.R.L.A. System

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «C.A.R.L.A. System» предназначен для количественного определения концентрации аллерген-специфического IgE в сыворотке и плазме крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Роль антител класса IgE в возникновении и развитии аллергических реакций известна уже достаточно давно (1,2). Связанные с поверхностью базофилов IgE-антитела, реагируют с антигенами за счет Fab фрагмента своей молекулы. После связывания IgE с аллергеном базофилы выделяют ряд вазоактивных веществ, которые определяют развитие аллергической симптоматики. Выявление и количественное определение концентрации аллерген-специфических IgE имеет большое значение при диагностике и исследовании аллергических заболеваний для выбора адекватной терапии (3,4,5).

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Данный набор позволяет количественно измерять концентрацию аллерген-специфического IgE в сыворотке крови человека методом двухстадийного «capture»-варианта иммуноферментного анализа (6). На первой стадии исследуемые образцы инкубируют с растворами биотинилированных аллергенов в лунках микропланшета, поверхность которых покрыта моноклональными антителами к IgE человека. В процессе инкубации молекулы IgE, содержащиеся в образце, связываются с твердой фазой. Если среди них имеются IgE, специфичные к конкретным аллергенам, то одновременно происходит связывание биотинилированного аллергена с молекулой аллерген-специфического IgE.

После удаления несвязавшегося материала и последующего промывания, в лунки добавляется конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена. Во время второй инкубации конъюгат стрептавидин-пероксидаза связывается с биотинилированным аллергеном. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству аллерген-специфического IgE в образцах.

Во время инкубации с раствором хромогена (тетраметилбензидин, ТМБ) в субстратном буфере происходит окрашивание раствора в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству аллерген-специфического IgE в образцах. Измерение оптической плотности производится на спектрофотометре при длине волны 450нм и 405нм.

Для количественного выражения концентрации специфического IgE на тот же микропланшет наносятся калибровочные пробы с известными концентрациями общего IgE, которые инкубируются с конъюгатом анти-IgE-биотин. Вторая инкубация с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза проводится одинаково для образцов и калибровочных проб.

После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация специфического IgE в образцах. Концентрация выражается в Международных Единицах (МЕ) общего IgE.

3. СОСТАВ НАБОРА:

Комплект для проведения иммуноферментной реакции (**Set Enzimatico**) выпускается в двух вариантах комплектации: на 96определений и на 192определения. В таблице1 указаны количества компонентов в зависимости от варианта комплектации.

Таблица 1

Наименование компонента	Количество компонента в зависимости от варианта комплектации	
	96 определений	192 определения
Комплект из 12 восьмилуночных стрипов, маркирован Piastra Sensibilizzata	1 пакет	2 пакета

Конъюгат стрептавидин-пероксидаза, маркирован Tracciante Enzimatico	1 флакон (23 мл)	1 флакон (50 мл)
Сыворотка для разведения анализируемых проб, маркирована Diluyente campioni	1 флакон (6 мл)	2 флакона (по 6 мл)
Концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован Soluzione Lavaggio	1 флакон (50 мл)	2 флакона (по 50 мл)
Раствор тетраметилбензидина, маркирован Cromogeno	1 флакон (15 мл)	3 флакона (по 15 мл)
Субстратный буфер, маркирован Tampone Substrato	1 флакон (15 мл)	3 флакона (по 15 мл)
Стоп-реагент, маркирован Reagente Bloccante	1 флакон (14 мл)	2 флакона (по 14 мл)
Самоклеящаяся пленка для закрывания планшета	2 листа	4 листа
Полиэтиленовый пакет с замком для хранения неиспользованных лунок планшета	1 шт.	2 шт.

3.2. Комплект калибровочных проб (**Set di Standard**) на 4 определения (в дубликатах). Состоит из следующих компонентов:

- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному стандарту WHO 75/502 на IgE человека, содержащие известные количества IgE: 0; 0,5; 1; 5; 25 и 100МЕ/мл, — 6 флаконов (по 1,5мл), маркированы **Standard0**, **Standard1**, **Standard2**, **Standard3**, **Standard4**, **Standard5**, соответственно;

- конъюгат анти-IgE-биотин, маркирован **Anti-IgE-Biotina** — 1 флакон (5,5мл).

3.3. Комплект аллергенов (**Allergeni**). Содержит флаконы с биотинилированными аллергенами – лиофилизированные препараты или жидкости (по 3мл во флаконе). На этикетках флаконов указаны кодовые номера и названия аллергенов. Содержимого одного флакона достаточно на 24 определения.

3.4. Контрольная сыворотка **C.A.R.L.A.-check** с известным содержанием специфических IgE к пяти часто встречающимся аллергенам, маркирована **Siero di Controllo**, лиофилизированный препарат – 1 флакон. Точные концентрации специфических IgE указаны в паспорте контрольной сыворотки. Наименования аллергенов перечислены в паспорте контрольной сыворотки и таблице 2.

Примечание: при использовании контрольной сыворотки в лаборатории должен иметься в наличии хотя бы один аллерген из перечисленных в Таблице 2.

3.5 Входящие в состав набора комплекты реагентов, перечисленные в п.п.3.1, 3.2, 3.3 и 3.4, могут быть приобретены независимо друг от друга.

Таблица 2

Кодовое обозначение аллергена	Наименование аллергена	Группа
d1	Dermatophagoides pteronyssimus	Клещевой
d2	Dermatophagoides farinae	Клещевой
e1	Эпителий кошки	Эпителиальный
g5	Райграсс многолетний Lolium perenne	Луговые травы
g6	Тимофеевка Phleum pratense	Луговые травы

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции моноклональных антител к IgE, использованных при изготовлении набора, с иммуноглобулинами классов A, G, M и D.

4.2. Коэффициент вариации результатов определения специфического IgE к одному и тому же аллергену в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора C.A.R.L.A.–system не превышает 8% по результатам одного анализа и 10% по результатам разных анализов. Ниже представлены результаты экспериментов по определению коэффициента вариации для трех сывороток с различными концентрациями специфического IgE к различным аллергенам.

Коэффициент вариации по результатам одного анализа

Сыворотка	Аллерген	Среднее значение оптической плотности \pm SD (МЕ/мл)	Коэффициент вариации	Количество параллелей
1	D1 Dermatophagoides pteronyssimus	1,24 \pm 0,06	4,8	10
2	E1 Эпителий кошки	18,70 \pm 0,58	3,1	10
3	G5 Райграсс многолетний Lolium perenne	24,65 \pm 1,14	4,6	10

Коэффициент вариации по результатам разных анализов

Сыворотка	Аллерген	Среднее значение оптической плотности \pm SD (МЕ/мл)	Коэффициент вариации	Количество исследований
1	D1 Dermatophagoides pteronyssimus	1,21 \pm 0,11	9,1	10
2	E1 Эпителий кошки	16,16 \pm 1,60	9,9	10
3	G5 Райграсс многолетний Lolium perenne	25,06 \pm 2,05	8,2	10

4.3. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация специфического IgE в сыворотке крови человека не превышает 0,15МЕ/мл.

4.4. Интерпретация результатов. Для клинических целей концентрации специфического IgE можно оценивать следующим образом:

Концентрация IgE	Класс	Уровень специфического IgE
\leq 0,5 МЕ/мл	0	Отсутствует или не поддается определению
0,51-1,0 МЕ/мл	1	Низкий
1,1-5,0 МЕ/мл	2	Средний
5,1-25,0 МЕ/мл	3	Высокий
25,1-75,0 МЕ/мл	4	Очень высокий
> 75,1 МЕ/мл	5	Исключительно высокий

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

5.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной

гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. Стоп-реагент представляет собой 1N раствор серной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно. Следует использовать только тщательно вымытую стеклянную посуду, не содержащую ионов металлов или следов окислителей.

5.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5.8. Некоторые реагенты содержат в качестве консерванта азид натрия. Чтобы предотвратить скопление взрывоопасных производных азидов в свинцовых и медных водопроводных трубах, реагенты следует смывать в канализацию большим объемом проточной воды.

5.9. Запрещается смешивать реагенты разных серий.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 405 нм и 450 нм в диапазоне 0–2ед.опт.пл.;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (шейкер), позволяющий производить встряхивание с частотой 1200 об/мин при комнатной температуре +18...25°C. (Модель ST3 производства фирмы ELM I или аналогичная по характеристикам);

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 500 мл;

- стаканы стеклянные;

- вода дистиллированная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Калибровочные пробы (**Standard**) готовы к использованию. После вскрытия флакона хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.2. Сыворотка для разведения анализируемых проб (**Diluyente campioni**) готова к использованию. После вскрытия хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.3. Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами (**Piastra Sensibilizzata**) необходимо выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

7.4. Конъюгат стрептавидин-пероксидаза (**Tracciante Enzimatico**) готов к использованию. После вскрытия флакона хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности.

7.5. Конъюгат анти-IgE-биотин (**Anti-IgE-Biotina**) готов к использованию. После вскрытия флакона хранить при температуре +2...+8°C в течение всего срока годности.

7.6. Промывочный буфер. Если во время хранения при температуре +2...+8°C во флаконе с маркировкой **Soluzione Lavaggio** образовались кристаллы, флакон следует выдержать при температуре +37°C в течение нескольких минут и тщательно перемешать до полного растворения кристаллов. В стеклянный стакан вместимостью 1000мл внести 450мл дистиллированной воды и добавить содержимое 1 флакона с

маркировкой **Soluzione Lavaggio**. Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Подготовленный к использованию промывочный буфер хранить закрытым не более 1 месяца при температуре +2...8°C.

7.7. Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) (**Cromogeno**) готов к использованию.

7.8. Субстратный буфер (**Tampone Substrato**) готов к использованию. **Непосредственно перед применением приготовить смесь равных объемов субстратного буфера и раствора ТМБ (субстратная смесь)** из расчета 200 мкл готовой субстратной смеси на 1 лунку планшета. Для приготовления смеси использовать только чистую стеклянную посуду, не содержащую ионов металлов и следов окислителей. Приготовленную субстратную смесь хранить в защищенном от света месте не более 1 часа.

7.9. Стоп-реагент (**Reagente Bloccante**) готов к использованию.

7.10. Растворы аллергенов. Жидкие аллергены готовы к использованию. После вскрытия флакона хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

Если препарат лиофилизован, внести в каждый флакон по 3,0 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения, избегая пенообразования. Хранить при температуре +2...8°C не более 2 месяцев; при необходимости более длительного хранения — при температуре -20°C и ниже в течение всего срока годности. Допускается не более 4 циклов замораживания-размораживания без потери связывающей способности.

7.11. Контрольная сыворотка (**Siero di Controllo**). Внести во флакон с маркировкой **Siero di Controllo** 1мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения, избегая пенообразования. Хранить при температуре +2...8°C не более 1 недели; при необходимости более длительного хранения — при температуре -20°C и ниже в течение всего срока годности. Допускается не более 3 циклов замораживания-размораживания.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. В зависимости от количества определяемых образцов и используемых аллергенов подготовить соответствующее количество реагентов, которые перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

8.2. Составить протокол маркировки лунок. Промаркировать лунки следующим образом:

A1 – лунка для определения оптической плотности субстратной смеси;

B1 – калибровочная проба 0 МЕ/мл (**Standard 0**);

C1 – калибровочная проба 0,5 МЕ/мл (**Standard 1**);

D1 – калибровочная проба 1 МЕ/мл (**Standard 2**);

E1 – калибровочная проба 5 МЕ/мл (**Standard 3**);

F1 – калибровочная проба 25 МЕ/мл (**Standard 4**);

G1 – калибровочная проба 100 МЕ/мл (**Standard 5**);

H1 – контрольная сыворотка (**Siero di Controllo**) (в том случае, если контрольная сыворотка исследуется в данном анализе).

8.3. Внести в соответствующие лунки по 100мкл калибровочных проб (**Standard**).

8.4. Внести в соответствующую лунку 50 мкл контрольной сыворотки (**Siero di Controllo**).

8.5. Внести в оставшиеся лунки по 50 мкл исследуемых сывороток. Количество репликатов каждой из исследуемых сывороток определяется количеством исследуемых аллергенов из расчета 1 лунка для каждого аллергена.

8.6. В лунки, содержащие исследуемые сыворотки крови и контрольную сыворотку, внести по 50 мкл сыворотки для разведения анализируемых образцов (**Diluyente del Campioni**).

8.7. В лунки, содержащие калибровочные пробы, внести по 100 мкл конъюгата анти-IgE-биотин (**Anti-IgE-Biotina**).

8.8. Внести в лунку с контрольной сывороткой 100 мкл раствора одного из аллергенов, перечисленных в Таблице 2 и паспорте контрольной сыворотки.

8.9. Внести в лунки с исследуемыми сыворотками крови по 100 мкл растворов требуемых аллергенов в соответствии с намеченной схемой.

8.10. Заклеить планшет самоклеящейся пленкой и инкубировать стрипы в течение 1 часа при комнатной температуре (+18...25°C) при встряхивании на шейкере с частотой 1200 об/мин.

8.11. По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавить по 350 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.6., с последующим декантированием. При каждом декантировании тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Допускается использовать автоматическое промывочное устройство для планшетов.

8.12. Немедленно внести по 200 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза (Tracciante Enzimatico) во все лунки, кроме лунки, предназначенной для определения оптической плотности субстратной смеси.

8.13. Закрыть планшет самоклеящейся пленкой и инкубировать в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере с частотой 1200 об/мин.

8.14. Снять самоклеящуюся пленку. Промыть планшет, как описано в п. 8.11.

8.15. Добавить во все лунки по 200 мкл смеси раствора ТМБ (Cromogeno) и субстратного буфера (Tampone Substrato), приготовленной как описано в п. 7.9.

8.16. Инкубировать планшет в течение 15 минут при комнатной температуре на шейкере, защищая от действия света с частотой 1200 об/мин.

8.17. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор хромогена, по 100 мкл стоп-реагента (Reagente Bloccante). Встряхнуть на шейкере в течение 1-2 минут.

8.18. Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при двух длинах волны: 405 нм и 450 нм.

8.19. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунке A1 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину B — значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить 2 калибровочных графика зависимости B (ед.опт.плотн.) от концентрации IgE в калибровочных пробах (МЕ/мл): по результатам измерений при длине волны 450 нм и при длине волны 405 нм.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности в лунке A1, то необходимо пользоваться формулой $B-B_0$, где B_0 — значение оптической плотности лунки A1.

Определить содержание IgE в пробах на основании калибровочных графиков. В случае если значение оптической плотности образца, измеренное при 450 нм, меньше 2,0 ед.опт.плотн., для вычислений следует использовать калибровочный график, полученный при длине волны 450 нм. Если значение оптической плотности образца при длине волны 450 нм больше 2,0 ед.опт.плотн., вычисления производят по графику, полученному при длине волны 405 нм.

Полученные значения концентрации IgE следует умножить на 2 (фактор разведения).

8.20. Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.15, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение 20 минут при комнатной температуре (+18...+25°C).

8.21. Пример вычислений приведен в таблице 3.

Запрещается применять приведенные значения вместо реальных экспериментальных данных.

Таблица 3

Название	Оптическая плотность при 450 нм	Концентрация специфического IgE	Оптическая плотность при 405 нм	Концентрация специфического IgE
Калибровочная проба 0МЕ/мл	0,0		0,0	.
Калибровочная проба 0,5МЕ/мл	0,094		0,033	.
Калибровочная проба 1МЕ/мл	0,197		0,070	.
Калибровочная проба 5МЕ/мл	0,958		0,342	.
Калибровочная проба 25МЕ/мл	2,900		1,035	.
Калибровочная проба 100МЕ/мл	>3,000		2,178	.
Образец 1 Аллерген W19 Постенница лекарственная <i>Parietaria officinalis</i>	0,360	3,4 МЕ/мл	.	.
Образец 2 Аллерген D1 <i>Dermatophagoides pteronyssimus</i>	1,848	26 МЕ/мл	.	.
Образец 3 Аллерген G5 Колосок душистый <i>Anthoxanthum odoratum</i>	0,025	0 МЕ/мл	.	.
Образец 4 Аллерген T9 Олива <i>Olea europea</i>	>2,000		1,978	172 МЕ/мл

9. ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАБОРА

В случае применения антибиотиков пенициллинаG, пенициллинаV, цефалоспорины, ампициллина и амоксициллина отрицательный результат анализа на специфический IgE против вышеперечисленных лекарственных средств не исключает наличия клинической гиперчувствительности к данным аллергенам. Отрицательный результат может появляться вследствие того, что возникновение гиперчувствительности протекает по IgE-независимым механизмам, либо оттого, что образцы крови получали в неподходящее время (до того, как в циркулирующей крови появились специфические IgE, или после того, как их концентрация упала).

Отрицательный результат анализа на специфические IgE против пищевых аллергенов и против укусов ядовитых насекомых не исключает возможности последующего развития клинической гиперчувствительности по отношению к этим аллергенам.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор C.A.R.L.A. system должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8° С в течение всего срока годности.

Сроки годности компонентов набора указаны на этикетках пакетов и флаконов. В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы (*Micropiastra Sensibilizzata*) хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2... 8°С в течение всего срока годности;
- конъюгат стрептавидин-пероксидаза (*Tracciante Enzimatico*), конъюгат анти-IgE-биотин (*Anti-IgE-Biotina*), раствор ТМБ (*Cromogeno*) и субстратный буфер (*Tampone Substrato*) после вскрытия флакона хранить при температуре +2...8°С в течение всего срока годности;

- буферный раствор для промывки лунок, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- калибровочные пробы (Standard), и сыворотку для разведения (Diluyente del Campioni) после вскрытия флаконов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- растворенную контрольную сыворотку (Siero di Controllo) хранить в течение 1 недели при температуре +2...8° C, при необходимости более длительного хранения – при температуре –20°C и ниже в течение всего срока годности. Допускается не более 3 циклов замораживания-размораживания.
- стоп-реагент (Reagente Bloccante) хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- готовые к использованию растворы аллергенов хранить при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- лиофилизированные аллергены после растворения хранить не более 2 месяцев при температуре +2...8°C, при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже до истечения срока годности. Допускается не более 4 циклов замораживания-размораживания.

10.2. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную и мутную сыворотку крови.

10.3. Пробы сыворотки и плазмы крови хранить при температуре +2...8°C не более 7 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания. В образцах плазмы крови могут присутствовать филаменты фибрина, которые оказывают влияние на результат анализа. Перед проведением анализа следует убедиться, что образцы полностью прозрачны.

10.4. При вскрытии и растворении лиофилизированных компонентов необходимо следить, чтобы на крышке и стенках флаконов не оставалось сухого вещества.

10.5. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение новой калибровочной кривой и рекомендуется определение концентрации специфического IgE в контрольной сыворотке.

10.6. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Реагент	Содержимое лунок					
	Лунка для обнуления	Калибровочная проба	Контрольная сыворотка	Исследуемые образцы		
Калибровочная проба (Standard)	---	100 мкл	---	---	---	---
Контрольная сыворотка (Siero di Controllo)*	---	---	50 мкл	---	---	---
Исследуемый образец	---	---	---	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Сыворотка для разведения образцов (Diluyente del Campioni)	---	---	50 мкл	50 мкл	50 мкл	50 мкл
Конъюгат анти-IgE-биотин (Anti-IgE-Biotina)	---	100 мкл	---	---	---	---
Аллерген 1	---	---	100 мкл*	100 мкл	---	---
Аллерген 2	---	---	---	---	100 мкл	---
Аллерген 3 и т.д.	---	---	---	---	---	100 мкл

Инкубация в течение 60 минут при комнатной температуре (+18...25°C) на шейкере (1200 об/мин)
Промывка 4 x 350 мкл промывочного буфера

Конъюгат стрептавидин- пероксидаза (Tracciante Enzimatico)	---	200 мкл				
	Инкубация в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере (1200об/мин) Промывка 4 x 350 мкл промывочного буфера					
Смесь раствора ТМБ с субстратным буфером (Cromogeno+ Tampone Substrato)	200 мкл	200 мкл	200 мкл	200 мкл	200 мкл	200 мкл
	Инкубация в течение 15 минут при комнатной температуре на шейкере (1200 об/мин) без доступа света					
Стоп-реагент (Reagente Bloccante)	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100 мкл	100мкл
	Измерение оптической плотности при 405 и 450 нм, расчеты					

Примечание:

* В лунку, содержащую контрольную сыворотку, добавляется раствор одного из пяти аллергенов, перечисленных в п.8.3: d1, d2, e1, g5, g6.

Ссылки:

1. Ishizaka K., Ishizaka T., and Hombrook M.M. J.Immunol. 97:75 (1966).
2. Ishizaka K., and Ishizaka T. J.Immunol. 99:1187 (1967).
3. Johansson S, Bennich J., and Berg T. Progress in Clin.Immunology, 1 (1972)
4. Kjellman M., Linkoping Univarsity medical Dissertations, 36 (1976).
5. Wide L., Bennich H., and Johansson S.G.O. Lancet II, 1105 (1967).
6. OlilvieriV., Beccarinil., GalucciG., RomanoT. and SantoroF. J.Immunol. Methods, 157:65 (1993).
7. Banfi G., Ferrara F., Bonini P., Colombo G., Plebani M., Borghesan F., Faggian D., Capito M., Andri L., Senna G.E., Baldassini M., Cortese M. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33:755 (1995).