

**СОДЕРЖАНИЕ**

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

**CONTENT**

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикиным

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА КЛАССА E (IgE) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «Общий IgE-ИФА»**

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «Общий IgE-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации общего иммуноглобулина класса E (IgE) в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Общий иммуноглобулин E (IgE) считается лабораторным маркером atopических заболеваний (атопической астмы, дерматита и риноконъюнктивита). Атопический (IgE-зависимый) механизм может также лежать в основе гастроэнтероколита, крапивницы, других форм васкулитов (в том числе системных), холецистита, вульвовагинита и цистита. Часть лекарственной аллергии (преимущественно на пенициллины и белковые препараты) также развивается по IgE-зависимому механизму. При всех вышеперечисленных состояниях выработка высоких титров специфических антител класса IgE может приводить к повышению уровня общего IgE в сыворотке. Особенно высокий уровень общего IgE характерен для atopического дерматита. Кроме atopических заболеваний, общий IgE сыворотки крови значительно повышается при паразитарных инвазиях и микозах (особенно системных), редко – при системных аутоиммунных заболеваниях и иммунодефицитных состояниях (особенно при гипер-IgE синдроме), а также при мастоцитозе (опухоль из тучных клеток) и чрезвычайно редкой IgE-миеломе. Снижение уровня общего IgE в сыворотке (ниже 15 МЕ/мл у взрослых) – явление редкое и малоизученное, описано при гипогаммаглобулинемиях, некоторых аутоиммунных заболеваниях, язвенном колите и первичном билиарном циррозе.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение общего иммуноглобулина класса Е (IgE) основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к общему IgE человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание общего IgE, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата кроличьих поликлональных антител к IgE человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в исследуемом образце. Концентрацию общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания общего иммуноглобулина класса Е (IgE) в калибровочных пробах.

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1. Специфичность.** Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к IgE с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
IgG	<0.1
IgM	<0.1
IgA	<0.1

### 3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания общего IgE в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «Общий IgE-ИФА» не превышает 8,0%.

### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации общего IgE в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей общий IgE, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 50-1000 МЕ/мл и составляет  $\pm 10,0\%$ .

### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации общего IgE предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 200 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «Общий IgE-ИФА» концентрация общего IgE в сыворотке (плазме) крови не превышает 6 МЕ/мл.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P200Z	SORB MTP	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C200Z	CAL 1-5	<b>Калибровочные пробы</b> на основе фосфатного буфера (pH 7.2-7.4), содержащие известные количества общего иммуноглобулина класса E (IgE) – <b>0; 50; 200; 500; 1000 МЕ/мл</b> , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q200Z	CONTROL	<b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием общего иммуноглобулина класса E (IgE), готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T200Z	CONJ HRP	<b>Конъюгат</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5 S011Z	DIL	<b>ИФА-Буфер</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K200I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «Общий IgE-ИФА»	1	шт.	-
11 K200Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Общий IgE-ИФА»	1	шт.	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

**5.2.** Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

**5.3.** При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

**5.4.** При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

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

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру  $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

**7.1.** Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдерживать при комнатной температуре ( $+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 мин.

### 7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре  $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности Набора.

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**8.1.** Набор реагентов «Общий IgE-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

**8.3.** В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

**8.4.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

**8.5.** Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

**8.6.** При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации общего иммуноглобулина класса E (IgE) в контрольной сыворотке.

**8.7.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	<b>Внесите во все лунки планшета по 50 мкл ИФА-Буфера.</b>
3	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сывотки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сывотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. <b>Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и <b>отмойте лунки 3 раза.</b> При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.</b>
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.</b>
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b>
9	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензида.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензида в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензида, <b>по 100 мкл стоп-реакента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП)</b> содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм.</b> Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставьте по калибровочной пробе С1.
12	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация общего IgE в калибровочных пробах (МЕ/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
13	Определите по калибровочному графику содержание общего IgE в исследуемых образцах.

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

**10.1.** Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

**Примечание.** Значения концентраций общего IgE в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (6 МЕ/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (1000 МЕ/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация общего IgE ниже 6 МЕ/мл или выше 1000 МЕ/мл.

В Наборе «Общий IgE-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в МЕ/мл. Для пересчета концентраций в пг/мл, полученное значение концентрации в МЕ/мл следует умножить на 2.15.

$$1 \text{ МЕ/мл} = 2.15 \text{ пг/мл}$$

Исследуемая группа	Единицы, МЕ/мл		Единицы доп., пг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
до 6 месяцев	-	12	-	25.8
6-12 месяцев	-	30	-	64.5
1-3 года	-	45	-	96.8
4-6 лет	-	70	-	150.5
7-9 лет	-	90	-	193.5
10-15 лет	-	120	-	258
>15 лет	-	130	-	279.5

## 11. ЛИТЕРАТУРА

1. Zetterstrom and Hohansson S.G.O. Allergy 1981; 36:537.
2. Buckley R. H. Immunopharmacology of Allergic Disease 1979; 117.
3. Michel f. B., Bousquet J. and Greilier P. J. Allergy Clin. Immunol. 1980; 64:422.
4. Ishizaka T. Ann Allergy 1982; 48: 313.
5. Kulczycki A. Jr. J. Allergy Clin. Immunol. 1981; 68:5.

По вопросам, касающимся качества Набора «Общий IgE-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:  
105043, Москва, а/я 58,  
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru  
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,  
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use*

## **A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL IgE IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA**

### **1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of total IgE in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of total IgE in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

### **2. SUMMARY AND EXPLANATION**

Total immunoglobulin E (IgE) serum level is widely reported as the laboratory marker of atopic diseases such as atopic asthma, atopic dermatitis, and pollenosis. Separately, high levels of total serum IgE are characteristic for parasitic infestations and some other clinical disorders including superficial and systemic mycosis. Decreased levels of IgE are found in cases of hypogammaglobulinemia, autoimmune diseases, ulcerative colitis, and primary biliary cirrhosis.

In allergic patients, serum total IgE level in general corresponds to the severity of the allergic disease and may be therefore used for monitoring of all kinds of anti-allergic therapy or allergen elimination.

### **3. PRINCIPLE OF THE TEST**

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific mAb to IgE epsilon. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies – rabbit polyclonal antibodies to IgE, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

#### 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

**4.2.** This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

**4.3. INFECTION HAZARD:** There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.

**4.5.** Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

**4.6.** Do not use the kit beyond the expiration date.

**4.7.** All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

**4.8.** Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

**4.9.** Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

**4.11.** Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

**4.13.** Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

**4.14.** Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

**4.15.** The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

## 5.1. Contents of the Kit

## 5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	Total IgE EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 50; 200; 500; 1000 IU/ml	5	pcs	red (C1 – colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 11 ml	1	pcs	red	until exp.date
5 DIL	EIA buffer, 11 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at 2...+8°C or 5 days at RT
8 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K200I	Instruction Total IgE EIA	1	pcs		N/A
11 K200Q	QC data sheet Total IgE EIA	1	pcs		N/A

**5.2. Equipment and material required but not provided**

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0,1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

**5.3. Storage and stability of the Kit**

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at 2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

**7. TEST PROCEDURE****7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

**7.2. Procedural Note:**

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

**7.3. Assay flowchart**

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

**7.4. Alternative units:**

1 IU/ml = 2.15 pg/ml

**7.5. Assay procedure**

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1-5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. NOTE: the calibrator/control and unknown sample wells are filled differently.
2	Pipet 50 µl of EIA buffer into the wells allocated for calibrator and controls. Pipet 50 µl of EIA buffer into the wells allocated for samples.
3	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5, control sample CONTROL and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water; Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times.
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape
7	Incubate 30 minutes at 37 °C.
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
10	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C.
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on first calibrator
14	Apply point-by-point method for data reduction.

**7.6. Handling notes**

Incubation at 37 °C may be replaced by incubation at +20...+25 °C with continuous shaking

**8. QUALITY CONTROL**

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

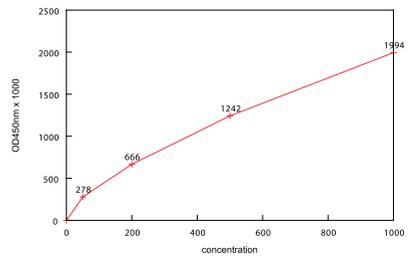
The test must be performed exactly as per the manufacturer’s instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

**9. CALCULATION OF RESULTS**

1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.
2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus total IgE concentration.
3. Determine the corresponding concentration of total IgE in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.
4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 IU/ml	0.08
CAL 2	50 IU/ml	0.36
CAL 3	200 IU/ml	0.75
CAL 4	500 IU/ml	1.32
CAL 5	1000 IU/ml	2.08



## 10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Total IgE. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

Sex, age	Units, IU/ml		Units alternative, pg/ml	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
<6 months	-	12	-	25.8
6-12 months	-	30	-	64.5
1-3 years	-	45	-	96.8
4-6 years	-	70	-	150.5
7-9 years	-	90	-	193.5
10-15 years	-	120	-	258
>15 years	-	130	-	279.5

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
IgG	<0.1
IgM	<0.1
IgA	<0.1

### 11.2. Analytical sensitivity.

Sensitivity of the assay was assessed as being 6 IU/ml.

### 11.3. Linearity.

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different total IgE concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

### 11.4. Recovery.

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known total IgE concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

## 12. LITERATURE

1. Zetterstrom and Hohansson S.G.O. Allergy 1981; 36:537.
2. Buckley R. H. Immunopharmacology of Allergic Disease 1979; 117.
3. Michel f. B., Bousquet J. and Greillier P. J. Allergy Clin. Immunol. 1980; 64:422.
4. Ishizaka T. Ann Allergy 1982; 48: 313.
5. Kulczynski A. Jr. J. Allergy Clin. Immunol. 1981; 68:5.

