

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКОГО IgE В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «СПЕЦ-IgE-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации аллерген-специфического IgE в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Специфические иммуноглобулины класса E (sIgE) участвуют в развитии аллергии I (немедленного) типа, симптомы которой (сенной насморк, конъюнктивит, крапивница, астма, анафилактический шок), проявляются, как правило, в течение 30 минут. Обнаружение аллерген-специфического IgE в сыворотке или плазме служит для диагностики аллергии I типа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение аллерген-специфического IgE основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышиные моноклональные антитела к IgE. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание IgE, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью биотинилированного аллергена и конъюгата стрептавидина 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 аллерген-специфического IgE в исследуемом образце. Концентрацию аллерген-специфического IgE в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания аллерген-специфического IgE в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Только для комплектации K200S

3.1. Специфичность. Использование мышиных моноклональных антител к IgE позволяет достичь высокой специфичности анализа.

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

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания аллерген-специфического IgE в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «СПЕЦ-IgE-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации аллерген-специфического IgE в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей аллерген-специфического IgE, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.35–17.5 МЕ/мл и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации аллерген-специфического IgE предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 0.7 МЕ/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая Набором «СПЕЦ-IgE-ИФА» концентрация аллерген-специфического IgE в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.05 МЕ/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P200SZ	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C200SZ	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе фосфатного буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества аллерген-специфического IgE – 0; 0.35; 0.7; 3.5; 17.5 МЕ/мл , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт	прозрачные жидкости красного цвета (калибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q200SZ	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием аллерген-специфического IgE, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
4	T200SZ	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	B200SZ	anti-IgE BIOTIN	Биотинилированные антитела к IgE, готовы к использованию (11 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
9	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
10	K200SI	-	Инструкция по применению Набора реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА»	1	шт	-
11	K200SQ	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «СПЕЦ-IgE-ИФА»	1	шт	-
*	Allergen-BIOTIN Биотинилированные аллергены (готовы к использованию, по 1.5 мл каждый, прозрачные жидкости синего цвета) <ol style="list-style-type: none"> D1-BIOTIN клещ домашней пыли (смесь родов Dermatophagoides spp.) (флакон с синей крышкой) E1-BIOTIN эпидермис кошки (флакон с красной крышкой) E2-BIOTIN эпидермис собаки (флакон с желтой крышкой) Gx-BIOTIN смесь пыльцы злаков (тимофеевка, ежа, овсяница, мятлик, лисохвост, пырей, рожь посевная) (флакон с сиреневой крышкой) W56-BIOTIN смесь пыльцы сорных трав (полынь обыкновенная, полынь горькая) (флакон с белой крышкой) Tx-BIOTIN смесь пыльцы деревьев (береза, ольха, орешник) (флакон с зеленой крышкой) 					

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (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, противоэпидемического 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;
- орбитальный шейкер (встряхиватель) для микропланшет, скорость 600–800 об/мин;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 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 выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °С) 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 °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «СПЕЦ-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 15 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;
- конъюгат, анти-IgE Биотин, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- биотинилированные аллергены следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности. Срок годности 18 месяцев;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- 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 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

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

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, 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. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

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 аллерген-специфического IgE в контрольной сыворотке.

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

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Только для комплектации K200S

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов - исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. Отметьте лунки, предназначенные для калибровочных проб и для исследуемых образцов.
2	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 сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
3	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 300–400 об/мин.
4	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавляйте 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.

5	ВНИМАТЕЛЬНО! Внесите в лунки для калибровочных проб и контрольной сыворотки по 100 мкл биотинилированных антител (B200SZ), а в лунки для исследуемых образцов соответствующий биотинилированный аллерген.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 60 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 300–400 об/мин.
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 3 раза.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +18...+25 °С и постоянном встряхивании со скоростью 300–400 об/мин.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина 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.
12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реакента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
14	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация СПЕЦ-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.
15	Определите по калибровочному графику содержание СПЕЦ-IgE в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

Только для комплектации K200S

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 аллерген-специфического IgE в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.05 МЕ/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (17.5 МЕ/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация СПЕЦ-IgE ниже 0.05 МЕ/мл или выше 17.5 МЕ/мл.

RAST-Класс	Единицы, МЕ/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
0 - неопределяемый	-	<0.35
1 - низкий	0.35	0.7
2 - средний	0.7	3.5
3 - высокий	3.5	17.5
4 - очень высокий	17.5	-

По вопросам, касающимся качества Набора «СПЕЦ-IgE-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
 105264, 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 ALLERGEN-SPECIFIC IGE IN HUMAN SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

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

This kit is designed for measurement of allergen-specific 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

Specific IgE (sIgE) mediates type I (immediate) allergic reactions, with usual onset of symptoms (allergic rhinitis, conjunctivitis, urticaria, asthma, anaphylactic shock) within 30 minutes after exposure. If allergen-specific IgE is found, it helps to make a diagnosis of type I allergy.

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 murine monoclonal antibody to human IgE. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Allergen-specific IgE bound are revealed by biotinylated allergen and streptavidin-HRPO complex. After 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_2SO_4 . 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. Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

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

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

	Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP	Specific 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; 0.35; 0.7; 3.5; 17.5 IU/ml	5	pcs	red (C1 - colourless)	2 months
3	CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	purple	2 months
4	CONJ HRP	Conjugate, 14 ml	1	pcs	red	until exp. date
5	SUBS TMB	Substrate solution, 14 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 26X	Washing solution concentrate 26X, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 45 days at 2-8 °C or 15 days at RT
7	STOP	Stop solution, 14 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
8	anti-IgE BIOTIN	Biotin labeled mAb to IgE (11 ml)	1	pcs	blue	until exp. date
9	N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10	K200SI	Instruction Specific IgE EIA	1	pcs		N/A
11	K200SQ	QC data sheet Specific IgE EIA	1	pcs		N/A

Allergen-biotin

Biotinylated allergens (ready-to-use, 1.5 ml each, blue transparent liquids).

1. **D1** – mixed allergens of Dermatophagoides spp. (vial with the blue cap).
2. **E1** – cat fur (vial with the red cap).
3. **E2** – dog hair (vial with the yellow cap).
4. **Gx** – mixed allergens of cereals: timothy, cocksfoot, Kentucky blue grass, meadow foxtail, twitch (couch) grass, rye, common (vial with the lilac cap).
5. **W56** – mixed pollen allergens of weeds: wormwood common and mugwort (vial with the white cap).
6. **Tx** – mixed pollen allergens of trees: birch, alder, hazel (vial with the green cap).

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;
- Microtiter plate shaker. Shaking should be medium to vigorous. Longitudinal shaking approximately 200 strokes/min, oscillations 600–800/min
- 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...+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.

Avoid freezing-thawing of samples!**Store serum/plasma samples at +2...+8 °C for nmt 7 days.**

Important notice: biotin (vitamin B7) in a sample may cause incorrect results. Patients should avoid biotin-containing food (liver, eggs, cereals (esp., soy), pea, codfish, chicken, pistachios, milk products), drugs and/or supplements during three days before testing.

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 26X by 26 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. 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.
2	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1-5 and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape
3	Incubate 60 minutes at +18...+25 °C and continuous shaking at 300-400 rpm
4	Prepare washing solution by 26X dilution of washing solution concentrate BUF WASH 26X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
5	ATTENTION! Dispense 100 µl of biotin labeled mAb to IgE solution into the wells allocated for calibrator and controls. Dispense 100 µl of biotin labeled allergen solution into the wells allocated for samples. Cover the wells by plate adhesive tape
6	Incubate 60 minutes at +18...+25 °C and continuous shaking at 300-400 rpm
7	Wash strips 3 times
8	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape
9	Incubate 30 minutes at +18...+25°C and continuous shaking at 300-400 rpm
10	Wash the strips 5 times
11	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
12	Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C
13	Dispense 100 µl of STOP into the wells
14	Measure OD (optical density) at 450 nm
15	Set photometer blank on first calibrator
16	Apply point-by-point method for data reduction

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

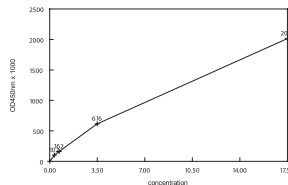
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus allergen-specific IgE concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of allergen-specific 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.

9.4. 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	0.06
CAL 2	0.35 IU/ml	0.16
CAL 3	0.7 IU/ml	0.22
CAL 4	3.5 IU/ml	0.68
CAL 5	17.5 IU/ml	2.08



10. EXPECTED VALUES

NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

RAST classes	Units, IU/ml	
	Lower limit	Upper limit
0 - not determined	-	<0.35
1 - low	0.35	0.7
2 - moderate	0.7	3.5
3 - high	3.5	17.5
4 - very high	17.5	-

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

High specificity is provided by use of mouse monoclonal antibodies to IgE.

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 0.05 IU/ml.

11.3. Linearity.

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

11.4. Recovery.

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