

Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testdurchführung sorgfältig lesen

Total IgE ALLERG-O-LIQ

Enzym Immuno Assay zur quantitativen Bestimmung von Total IgE in humanem Serum oder Plasma

REF 08101FL

96 Bestimmungen

HINTERGRUND

Allergische Reaktionen vom Soforttyp (Typ I Allergie) werden durch Allergen-spezifische Immunglobuline der Klasse E (IgE) vermittelt. Die normale Serumkonzentration von IgE ist altersabhängig und erreicht den höchsten Wert im Alter von 6-15 Jahren. In vielen Fällen geht das Auftreten von Allergen-spezifischem IgE mit einem deutlichen Anstieg der Gesamt-IgE Konzentration im Blut der Patienten einher. In diesen Fällen kann der IgE Spiegel im Blut um das 1000fache ansteigen. Angegeben wird die IgE Konzentration in IU/mL wobei 1 IU ungefähr 2,4 ng IgE entspricht. Die höchsten IgE Konzentrationen (bis zu 50000 IU/mL) werden bei Patienten mit atopischer Dermatitis gefunden. Darüber hinaus treten erhöhte Gesamt-IgE Spiegel auch bei Parasitosen auf. Von der Norm abweichende Titer wurden auch bei bestimmten Autoimmunerkrankungen beschrieben.

VERWENDUNGSZWECK

Der vorliegende Total IgE Test ist zur Konzentrationsbestimmung von Gesamt-IgE in humanem Serum oder Plasma zu verwenden und unterstützt die Diagnose von Typ I Allergien. Ferner ist die Bestimmung von Gesamt IgE bei Verdacht auf Parasitosen empfohlen.

TESTPRINZIP

Der Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung von Total IgE in humanem Serum oder Plasma ist ein „Sandwich ELISA“ der in Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Die einzelnen Kavitäten sind mit Anti-human-IgE beschichtet, wodurch im ersten Inkubationsschritt die Gesamt-IgE Fraktion aus der Patientenprobe gebunden wird. Überschüssige Serum-/Plasmakomponenten werden durch Waschen entfernt. Die Detektion des Gesamt-IgE erfolgt über ein Anti-IgE Biotin Konjugat unter Bildung festphasengebundener Anti-IgE/IgE/Konjugat-Komplexe. Nach der Entfernung überschüssiger Anti-IgE Biotin Moleküle wird Streptavidin-HRP-Konjugat zugegeben. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgt die Zugabe des HRP-Substrates 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mittels Säure schlägt die Farbe nach gelb um.

Die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes wird bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Die IgE-Konzentration in der Patientenprobe ist direkt proportional zu der ermittelten OD. Als Referenz dienen Kalibratoren mit bekannten IgE-Konzentrationen (kalibriert an WHO 75/502). Anhand der ODs der Kalibratoren wird eine Standardkurve generiert, mit deren Hilfe die IgE-Konzentrationen der unbekannt Proben ermittelt werden können.

KITKOMPONENTEN

Mikrotiterplatte, Anti-IgE beschichtet	MICROWELL	12 Streifen à 8 wells
Anti-IgE Biotin	BIOTIN AB E	1 x 16 mL
Streptavidin-HRP Konjugat	CONJ HRP STREP	1 x 16 mL
Waschpuffer-Konzentrat (25x)	WASHBUF B 25x	1 x 50 mL
TMB Substrat	SUB TMB	1 x 16 mL
Stopplösung (0,5 M H ₂ SO ₄)	STOP H₂SO₄	1 x 16 mL
Verdünnungspuffer	DILBUF A	1 x 50 mL
IgE-Kalibrator 1 * (0 IU/mL)	CAL 1	1 x 1,5 mL
IgE-Kalibrator 2 * (0,7 IU/mL)	CAL 2	1 x 1,5 mL
IgE-Kalibrator 3 * (3,5 IU/mL)	CAL 3	1 x 1,5 mL
IgE-Kalibrator 4 * (17,5 IU/mL)	CAL 4	1 x 1,5 mL
IgE-Kalibrator 5 * (50 IU/mL)	CAL 5	1 x 1,5 mL
IgE-Kalibrator 6 * (100 IU/mL)	CAL 6	1 x 1,5 mL
IgE-Kontrolle niedrig	CONTROL L	1 x 1,5 mL
IgE-Kontrolle hoch	CONTROL H	1 x 1,5 mL

*Kalibratoren sind vorverdünnt; Konzentrationen sind mit 10 zu multiplizieren.

BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

10-100 µL, 200-1000 µL Pipetten, Multipette, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung, graduierter Messzylinder, ELISA-Reader (450 nm Filter, empfohlen zusätzlich 620 nm Filter), Abdeckfolie, Laborwecker (Uhr), destilliertes Wasser, Mikrotiterplattenwascher (optional).

PROBENHANDHABUNG

Für den Test kann entweder Serum oder Plasma eingesetzt werden. Es sind keine Konservierungsmittel für die Proben erforderlich.

Die Serumproben sind bei 2-8 °C für eine Woche stabil. Bei längerer Lagerung sind die Proben einzufrieren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Eingefrorene Proben bei Raumtemperatur (RT; 20-25°C) auftauen und vor Gebrauch gründlich mischen. Die Proben sind unverdünnt zu testen. Lipämische und hämolytische Seren dürfen nicht verwendet werden

REAGENZIVORBEREITUNG

Alle Proben und Reagenzien sind vor ihrem Gebrauch auf RT zu bringen.

Nicht benötigte Teststreifen sind mit dem Trockensäckchen im sorgfältig verschlossenen Aluminiumbeutel aufzubewahren.

Verdünnungspuffer:	gebrauchsfertig
Anti-IgE Biotin:	gebrauchsfertig
Enzymkonjugat:	gebrauchsfertig
Kalibratoren:	gebrauchsfertig
Substratlösung:	gebrauchsfertig
Stopplösung:	gebrauchsfertig

Waschpufferkonzentrat:

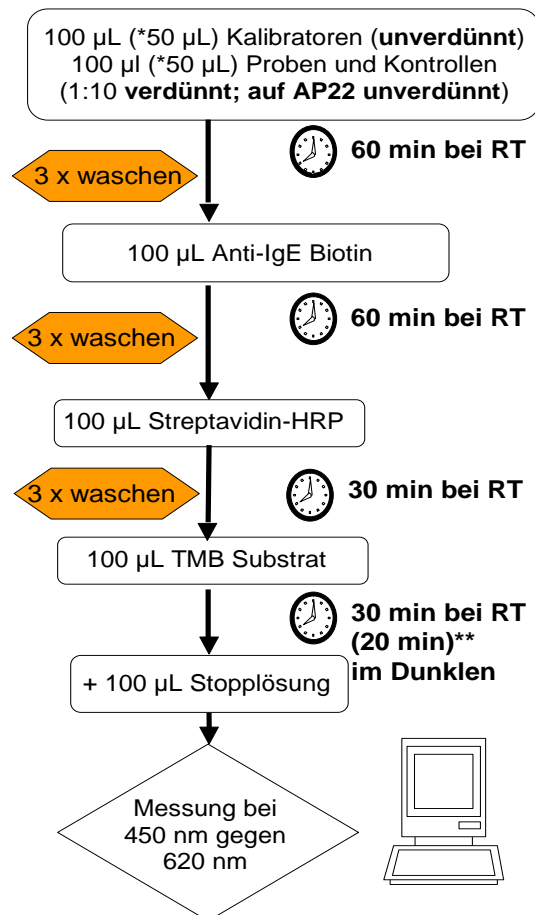
Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:25 verdünnt (Beispiel: für zwei Streifen werden 40 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu 1,6 mL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf 40 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

TESTDURCHFÜHRUNG

- Zunächst muss ein Testprotokoll erstellt werden. Es wird empfohlen die Kalibratoren und die Kontrollen in Doppelbestimmungen zu messen.
- Benötigte anti-IgE beschichtete Kavitäten in einen Rahmen einsetzen. Aluminiumbeutel mit verbleibenden Streifen und Trockensäckchen anschließend wieder gut verschließen.
- 90 µL Verdünnungspuffer in die Anti-IgE-beschichteten Kavitäten verteilen (Ausnahmen: für Kalibratoren vorgesehene Kavitäten und bei Abarbeitung mit AP22) und 10 µL Kontrollen und Patientenproben in den vorgelegten Verdünnungspuffer pipettieren. 100 µL der unverdünnten Kalibratoren in dafür vorgesehene Kavitäten pipettieren (*50 µL bei Abarbeitung auf dem AP22).
- Die Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
- Die Kavitäten in drei Waschzyklen mit je 300 µL Waschlösung pro Kavität manuell oder mit einem geeigneten Waschergerät waschen. Restflüssigkeit durch Ausklopfen auf einem Papiertuch entfernen.

- 100 µL Anti-IgE Biotin in jede Kavität pipettieren. Die Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
- Platte erneut (wie unter Punkt 5 beschrieben) waschen.
- 100 µL Streptavidin-HRP-Konjugat in jede Kavität pipettieren. Die Platte abdecken und 30 min bei RT inkubieren.
- Platte erneut (wie unter Punkt 5 beschrieben) waschen.
- 100 µL TMB Substrat in jede Kavität pipettieren und die Platte abgedeckt 30 min (**20 min auf dem AP22) bei RT im Dunklen inkubieren.
- In jede Kavität je 100 µL Stopplösung in gleicher zeitlicher Reihenfolge wie bei der Substrat-Zugabe pipettieren. Es empfiehlt sich, die Lösung in den Kavitäten durch leichtes Klopfen gegen den Rahmen der Platte zu mischen. Nach 5 min Platte(n) bei 450 nm in einem geeigneten ELISA-Reader messen (Referenzwellenlänge 620 nm). Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen werden, wie auf Seite 3 beschrieben, berechnet.

TESTSCHEMA Total IgE ALLERG-O-LIQ



* 50 µL bei Abarbeitung auf dem AP22

** 20 min Inkubation auf dem AP22



DR . FOOKE

Laboratorien GmbH Tel.: 0049-2131-2984-0
Habichtweg 16 Fax: 0049-2131-2984-184
4 1 4 6 8 Neuss

E-mail: information@fooke-labs.de

Internet: www.fooke-labs.de

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Für die Berechnung der Ergebnisse wird empfohlen eine validierte Auswertesoftware einzusetzen. Für eine manuelle Berechnung werden die Mittelwerte der ODs [Δ 450 nm – 620 nm] aus den Doppelbestimmungen der Kalibratoren und Kontrollen berechnet. Mit den OD-Mittelwerten der sechs Kalibratoren wird eine Standardkurve auf halblogarithmischem Papier konstruiert (Abszisse: log IU IgE/mL; Ordinate: lineare OD Δ 450 nm – 620 nm). Anhand der Standardkurve werden die IgE Konzentrationen der jeweiligen Patientenprobe und der Kontrollen durch Einsetzen des OD-Wertes auf der Ordinate und Ablesen des Ergebnisses in IU/mL auf der Abszisse ermittelt. Die Standardkurve und die Kontrollen sollten im Vertrauensbereich des mitgelieferten Qualitätskontrollzertifikates liegen. Andernfalls sind die Testbedingungen zu überprüfen und der Test gegebenenfalls zu wiederholen.

BEISPIELSTANDARDKURVE

Kalibrator-konzentration (IU/mL)	OD 450 nm Mittelwert (n=22)	Referenzbereich OD 450 nm
0	0,039	0,027 - 0,051
7	0,155	0,108 - 0,201
35	0,564	0,395 - 0,733
175	1,823	1,276 - 2,370
500	2,648	1,854 - 3,443
1000	3,189	2,233 - 4,146

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, in jedem Labor die altersabhängigen Normbereiche über einen Zeitraum mit statistisch relevanter Probenzahl selbst zu ermitteln bevor eine klinische Bewertung der Ergebnisse erfolgt. Die hier aufgelisteten Ergebnisse (Wittig *et al.*) können als Leitlinie für die eigenen Referenzwerte verwendet werden.

Alter (Jahre)	n	MW (IU/mL)	MW + 1 SA (IU/mL)
1-2	29	20	64
3-5	31	35	119
6-15	45	51	150
16-20	59	38	123
21-30	114	27	100
31-40	38	34	113
>40	109	34	114
Ges	425	32	108

MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung

MESSBEREICH

Dieser ELISA erfasst IgE-Konzentrationen im Bereich von 5 bis 1000 IU/mL. Proben, deren IgE-Konzentration über 1000 IU/mL liegen, sollten verdünnt und erneut getestet werden, um die genaue IgE-Konzentration zu ermitteln.

PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit

1. Intra-Assay Varianz

(1 Test in Vierfachbestimmung)

Serum	Mittelwert IU/mL	VK (%)
1 (n=4)	339,7	3,9
2 (n=4)	41,5	1,5
3 (n=4)	9,4	8,8

2. Inter-Assay Varianz

(2 Tests in Doppelbestimmung)

Serum	Mittelwert IU/mL	VK (%)
1 (n=4)	331,0	3,0
2 (n=4)	105,3	0,5
3 (n=4)	34,1	1,7

LINEARITÄT

Fünf zufällig ausgewählte Seren zeigen einen linearen Verlauf ($\leq \pm 20\%$) in fünf aufeinander folgenden Verdünnungsstufen. Aufgrund der Heterogenität humaner Serum- oder Plasmaproben können dennoch abweichende Ergebnisse gefunden werden.

SPEZIFITÄT

Dieser IgE Test zeigt in physiologischen Konzentrationen keine Kreuzreaktivität mit anderen Ig-Klassen

ÜBEREINSTIMMUNG MIT REFERENZMETHODE

Der Korrelationskoeffizient wurde mit $R^2 = 0,96$ (zu Total IgE HRP EIA, REF: 08102CP) und $R^2 = 0,88$ (ImmunoCAP®) bestimmt.

LITERATUR

- Ishizaka K, Ishizaka, T, 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.
- Hamilton R: **Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease.** *Ligand Quarterly* 1979, **2**:13-19.
- Johansson S, Bennich H, Berg T: **The Clinical Significance of IgE,** *Progress in Clin Immunol* 1972, **1**
- Kjellman M: **Immunoglobulin IgE and Atopic Allergy in Childhood.** *Linköping University Medical Dissertations* 1976, No 36.
- Wittig, H., Bellot, J., Fillippi, I. and Royal, G.: **Age-related Serum IgE Levels in Healthy Subjects and in Patients with Allergic Disease.** *J Allergy Clin Immunol* 1980, **66**:305-313.
- Gleich, G., Averbeck, A., and Swedlund, H.: **Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay.** *J Lab and Clin Med* 1971, **77**:690-698.
- Arbeitsgruppe der Deutschen Diagnostika Gruppe e.V. (DDG). **Gute Labordiagnostische Praxis GLDP, Konzept einer „Guten Labordiagnostischen Praxis“.** *Clin Lab* 1999, **45**: 569-580.

WICHTIGE HINWEISE

1. Gemäß Anhang I der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von *in-vitro*-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit zu gewährleisten. Daher sind die vom Hersteller festgelegten Zweckbestimmungen vom autorisierten Anwenderkreis zu beachten. Dieser Testkit ist ausschließlich für die im Verwendungszweck (siehe Seite 1) angegebene Zweckbestimmung vorgesehen.
2. Der Test ist nach dieser Gebrauchsanweisung durchzuführen, die alle notwendigen Informationen, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise enthält. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode erweitert zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
3. Das Produkt darf nur von geschultem Fachpersonal angewendet werden. Schwangere sollten den Test nicht durchführen.
4. Verwendete Geräte sind gemäß den Herstellerangaben regelmäßig zu warten und vor ihrem Gebrauch auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen.
5. Die Reagenzien sind nur für *in-vitro*-Diagnostik und zum Einmalgebrauch bestimmt. Reagenzien, deren Verfallsdatum überschritten ist, dürfen nicht verwendet werden. Keine Reagenzien anderer Hersteller oder Kitkomponenten unterschiedlicher Chargen (Ausnahmen s. Seite 1) mit den Reagenzien dieses Testkits kombinieren.
6. Kitkomponenten nicht benutzen, wenn die Verpackung der Komponenten beschädigt ist. Vor Gebrauch alle Lösungen optisch auf mikrobielle Kontamination prüfen. Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden. Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht vertauschen.
7. Der Testkit wurde validiert für die im Testschema (siehe Seite 2) angegebenen Temperaturen. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen können die Ergebnisse von den Referenzbereichen abweichen.
8. Die Waschprozedur ist von entscheidender Bedeutung. Unzureichendes Waschen führt zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Verwendung von Multi- bzw. Mehrkanalpipetten und automatischen Washern wird empfohlen.
9. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren. Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
10. Testkomponenten humanen Ursprungs (Kalibratoren und Kontrollen) wurden mit CE-gekennzeichneten Methoden auf Anti-HIV-1/2, HBsAg, Anti-HBc und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Ungeachtet dieser Resultate sollten alle Reagenzien auf Humanserumbasis als potentiell infektiös (biogefährdend) betrachtet werden.
11. Einige Kitkomponenten können Rinderserumalbumin enthalten, von dem laut Lieferant keine Infektiösität bekannt ist. Da möglicherweise nicht nachweisbare infektiöse Agentien vorhanden sein könnten, wird empfohlen, generell alle Produkte tierischer Herkunft als potentiell infektiös zu betrachten.
12. Auf folgende Sicherheitsbestimmungen für alle Reagenzien wird besonders hingewiesen:
 - Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen (P262). Aerosol nicht einatmen (P 260). Niemals mit dem Mund, sondern nur mit genormten Pipettierhilfen pipettieren.
 - BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen (P301/330/331).
 - BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen (P303/361/353).
 - BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert (P304/340).
 - BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen (P305/351/338).
 - Essen, Rauchen und Trinken während der Arbeit ist nicht gestattet. Reagenzien von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fern halten.
 - Während der Arbeit mit Kitreagenzien oder Patientenproben Kittel, Schutzbrille und Einmalhandschuhe tragen (P280). Nach der Arbeit die Hände gründlich waschen (P264).
 - Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich.
13. Stopplösung verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden (H314).
14. Möglicherweise ist TMB in hohen Konzentrationen potentiell mutagen. Aufgrund der geringen Konzentration von TMB in der Substratlösung ist eine mutagene Wirkung bei ordnungsgemäßigem Gebrauch ausgeschlossen.
15. Die enthaltenen Konservierungsmittel (Bronidox L, Thimerosal, Azid) sind giftig für Wasserorganismen, haben aber keine gewässergefährdende Konzentration mehr. Große Mengen Reagenzien sollten vor der Beseitigung mit Wasser verdünnt werden. Thimerosal (WashBuf B) kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition (H373).
16. Serumhaltige Abfälle müssen in Abfallbehältern gesammelt werden, die ein geeignetes Desinfektionsmittel in ausreichender Konzentration enthalten. Abfälle müssen entsprechend den Regularien des jeweiligen Landes behandelt werden.
17. Wir weisen auf die Medizinproduktebetreiber-Verordnung, die Richtlinie der Bundesärztekammer (RiliBÄK) in ihrer aktuellen Version und auf die „Gute Labordiagnostische Praxis, GLDP“ hin.



DR. FOOKE

Laboratorien GmbH

Habichtweg 16

4 1 4 6 8 Neuss

E-mail: information@fooke-labs.de

Internet: www.fooke-labs.de

Tel.: 0049-2131-2984-0

Fax: 0049-2131-2984-184

Lot-Nummer	CE-Konformitätskennzeichnung	<i>In-vitro</i> Diagnostikum	Temperaturbegrenzung	Verwendbar bis	Bestellnummer	Gebrauchsanweisung beachten	Begleitdokumente beachten	Nicht benutzen, wenn die Verpackung zerstört ist	Einmalgebrauch	Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	Hergestellt von	Biogefährdend