

Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testarbeit sorgfältig lesen

Spezifischer IgG4 - ELISA

Enzym Immuno Assay zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgG4 in humanem Serum oder Plasma

REF 10104PG

 96 Bestimmungen

HINTERGRUND

Immunglobuline (Ig) der IgG4-Subklasse spielen eine entscheidende Rolle bei der humoralen Immunantwort während einer Immuntherapie, z.B. gegen Insektengifte (Biene und Wespe). Das Ansteigen der IgG4 Konzentration weist auf einen erfolgreichen Verlauf der Immuntherapie hin. Über spezifisches IgG4 wurde berichtet, dass es mit IgE um die Bindung an das korrespondierende Antigen (Allergen) konkurriert. Daher wird angenommen, dass spezifisches IgG4 zu einer Reduktion der Fähigkeit zur Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten führt.

VERWENDUNGSZWECK

Der IgG4 – ELISA Test weist spezifisches IgG4 in humanem Serum oder Plasma nach. Der Test kann zur Verlaufskontrolle während und nach einer Hyposensibilisierung eingesetzt werden.

TESTPRINZIP

Das Testsystem basiert auf dem Prinzip des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) und detektiert antigen- (allergen-) spezifische IgG4-Antikörper.

Verdünntes Patientenserum oder -plasma wird in Antigen-beschichteten Mikrotiter-Teststreifen inkubiert. Dabei binden spezifische IgG4-Antikörper der Patientenproben an die Antigene (Allergene). Ungebundene Antikörper werden anschließend durch Waschen entfernt. Die Allergen-spezifisch gebundenen Antikörper werden von einem zweiten Anti-human-IgG4 Antikörper erkannt, welcher an eine Horseradish peroxidase (HRP) gekoppelt wurde.

Die gebundenen IgG4/anti-IgG4/HRP-Komplexe werden nach einem erneuten Waschschritt durch die Zugabe des HRP-Substrates 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt, nachgewiesen. 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 IgG4-Konzentration in der Patientenprobe ist direkt proportional zu der ermittelten OD. Als Referenz dienen Kalibratoren mit bekannten IgG4-Konzentrationen. Anhand der ODs der Kalibratoren wird eine Standardkurve generiert, mit deren Hilfe die IgG4-Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt werden können.

KITKOMPONENTEN

Komponenten	Symbol	10104PG
Anti-IgG4-Enzym-konjugat	CONJHRPG₄	1 x 10 mL
Waschpuffer-konzentrat B	WASHBUF B25x	1 x 30 mL
TMB Substrat	SUBTMB	1 x 12 mL
Stopplösung (0.5 M H ₂ SO ₄)	STOPH₂SO₄	1 x 6 mL
Verdünnungspuffer	DILBUF B	1 x 100 mL

MATERIAL, DAS BENÖTIGT WIRD, JEDOCH NICHT IM KIT ENHALTEN IST

1.Referenzkit	REF	12004PG
Referenz Kavitäten	REFWELL	6 x 8 wells
Kalibratoren (100, 250, 500, 2500 U/mL)	CAL	4 x 1 mL
Kontrolle hoch	CONTROL H	1 x 1 mL
Kontrolle niedrig	CONTROL L	1 x 1 mL

2. Antigen-beschichtete Riegel	REF	13-code-G
--------------------------------	------------	-----------

LABORBEDARF

Pipetten: 10 bis 100 µL, 200 bis 1000 µL, Multipette, Röhrchen zur Verdünnung der Patientenproben, Pipettenspitzen, graduiertes Messzylinder, Mikrotiterplattenphotometer, Brutschrank, Abdeckfolie, Laborwecker (Uhr). Optional: Mikrotiterplattenwaschgerät

PROBENVORBEREITUNG

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 werden 1:101 verdünnt (10µL Serum + 1mL Verdünnungspuffer). Lipämische und hämolytische Seren dürfen nicht verwendet werden.

REAGENZIVORBEREITUNG

Alle Seren und Reagenzien sind vor ihrem Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen.

Verdünnungspuffer:

Gebrauchsfertig

Konjugatlösung:

Gebrauchsfertig

Standards:

Gebrauchsfertig

Kontrollen:

Gebrauchsfertig

TMB Substrat:

Gebrauchsfertig

Stopplösung:

Gebrauchsfertig

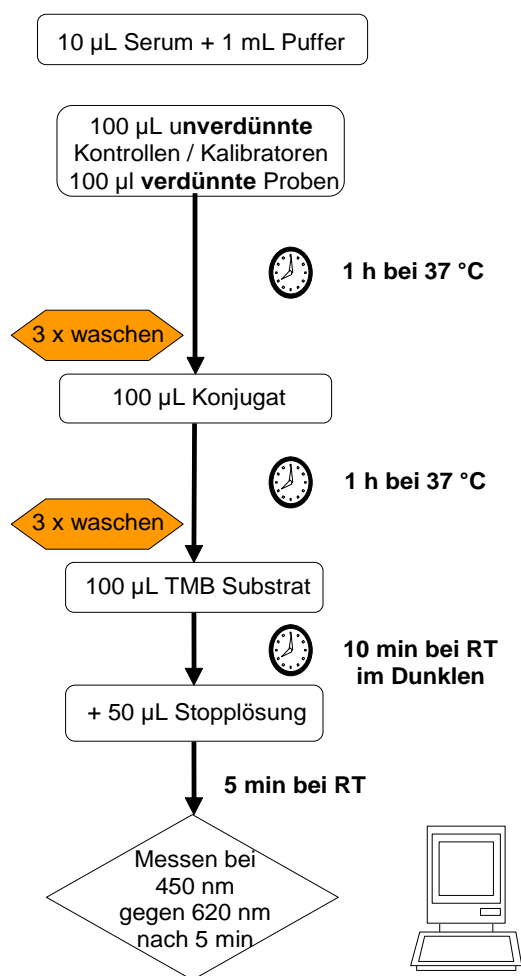
Waschlösung: 30 mL Waschpufferkonzentrat werden mit destilliertem Wasser auf 750 mL aufgefüllt. Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Zunächst muss ein Testprotokoll erstellt werden. Es wird empfohlen die Kalibratoren und die Kontrollen in Doppelbestimmungen zu messen.
2. Patientenproben **1:101** mit Verdünnungspuffer verdünnen (10 µL Serum + 1 mL Verdünnungspuffer).
3. Einen Teststreifen des Referenzsatzes und die benötigte Anzahl an antigenbeschichteten Teststreifen in den Rahmen einsetzen. Nicht benutzte Referenzriegel oder Allergiestreifen wieder sorgfältig in den Alubeutel verpacken (mit Trockenmittel).
4. Je 100 µL der Standards und Kontrollen und 100 µL der verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren (siehe Plattenmatrix).
5. Die Teststreifen mit einer Folie abdecken und für 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
6. Nach der Inkubation den Inhalt aus den Kavitäten absaugen und 3 x mit mindestens je 500 µL Waschpuffer/Kavität waschen. Die Waschschriffe können manuell oder mit einem validierten Mikrotiterplatten-Washer durchgeführt werden. Restflüssigkeit durch Ausklopfen entfernen.

7. Je 100 µL Enzymkonjugat in jede Kavität pipettieren, mit einer Folie abdecken und für eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
8. Waschen wie unter Punkt 6 beschrieben.
9. 100 µL TMB-Substrat in jede Kavität pipettieren, die Teststreifen mit einer Folie abdecken und für 10 min im Dunklen inkubieren.
10. 50 µL Stopplösung/Kavität in der gleichen Reihenfolge und im gleichen Zeittakt wie bei der TMB-Zugabe pipettieren. Es wird empfohlen die Lösungen durch Antippen der Strips zu mischen.
11. 5 min stehen lassen um eine ausreichende Homogenisierung zu ermöglichen. Sofort messen bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) am ELISA-Reader.

TESTSCHEMA Spezifischer IgG4 - ELISA



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 vier Kalibratoren wird eine Standardkurve auf halblogarithmischem Papier konstruiert (Abszisse: log U IgG4/mL; Ordinate: lineare OD Δ 450 nm - 620 nm). Anhand der Standardkurve werden die IgG4 Konzentrationen der jeweiligen Patientenprobe und der Kontrollen durch Einsetzen des OD-Wertes auf der Ordinate und Ablesen des Ergebnisses in U/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

Achtung: Da die Kalibratoren nicht verdünnt werden, ist es **bei manueller Berechnung** notwendig, die **Ergebnisse der Patientenproben mit 101 zu multiplizieren**, um die in der Patientenprobe vorhandene IgG4-Konzentration zu erhalten. Wenn die Ergebnisse mit ALLERG-O-SCREENING berechnet werden, ist kein weiterer Berechnungsschritt notwendig.

MESSBEREICH

Dieser IgG4 ELISA erfasst IgG4 Konzentrationen im Bereich von 100 U/mL bis 2500 U/mL. Seren mit mehr als 2500 U/mL IgG4 sollten zur genauen Bestimmung des IgG4 Gehaltes verdünnt und erneut getestet werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

spez. IgG4 (U/mL)	Interpretation
< 100	negativ
100-250	grenzwertig
>250	positiv

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE

Die klinische Relevanz eines positiven Befundes variiert zwischen den verschiedenen Antigenen sehr deutlich. Daher wird empfohlen, in jedem Labor die Normbereiche für jedes Antigen über einen bestimmten Zeitraum und einer statistisch relevanten Anzahl von Testdurchführungen selbst zu ermitteln. Die oben aufgelisteten Ergebnisse können als Leitlinie für die eigenen Referenzwerte verwendet werden.

PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit

1. Intra-Assay (n=10)

Serum	U/mL	VK (%)
1	204,8	7,55
2	140,4	14,88
3	215,4	6,99

2. Inter-Assay (n=20)

Serum	U/mL	VK (%)
1	212,3	10,15
2	139,9	17,7
3	230,4	9,08

BEISPIELSTANDARDKURVE

Standard Konzentration	Mittelwert OD 450 nm	Referenz-Bereich OD 450 nm
100 U/mL	0,182	0,150 \pm 0,10
250 U/mL	0,345	0,250 \pm 0,15
500 U/mL	0,595	0,600 \pm 0,20
2500 U/mL	2,000	2,000 \pm 0,60

LITERATUR

1. Aalberse R.C. et al.: **Allergen-specific IgG4 in atopic disease.** *Allergy* 1993, **48**:559-569.
2. Garcia et al.: **Modifications in IgG subclass in the course of immunotherapy with grass pollen.** *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993, **3**:19-25.
3. Harris et al.: **The development of specific IgG4 after immunotherapy with standardized extracts.** *N Engl Reg Allergy Proc* 1987, **8**:429-435.
4. Hedlin et al.: **Long-term follow up of patients treated with a three-year course of cat or dog immunotherapy.** *J Allergy Clin Immunol.* 1995, **96**:879-885.
5. Van der Zee & Aalbers: **IgG4 and hyposensitization.** *N Engl Reg Allergy Proc* 1987,**8**:389-391.

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 Infektiosität 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 (P260). Niemals mit dem Mund, sondern nur mit geeigneten 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

Tel.: 0049-2131-2984-0
Fax: 0049-2131-2984-184

E-mail: information@fooke-labs.de
Internet: www.fooke-labs.de

Los-Nummer	CE-Konformitätskennzeichnung	In-vitro 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