

Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testdurchführung sorgfältig lesen

Spezifisches IgE EAST

Enzym Allergo Sorbent-Test zur quantitativen Bestimmung von allergen-spezifischem IgE in humanem Serum oder Plasma

REF	0540200PKL	Σ	200 Bestimmungen
REF	0541000PKL	Σ	1000 Bestimmungen

HINTERGRUND

Die Häufigkeit von Allergien hat in den letzten Jahrzehnten weltweit stark zugenommen. Unter Allergien versteht man krankhafte Immunreaktionen vom Typ I (Soforttypreaktion), deren Symptome im Allgemeinen innerhalb von 30-60 Minuten auftreten. Als Krankheitsanzeichen sind unter anderem zu nennen: Heuschnupfen (Rhinitis), Bindehautentzündung (Konjunktivitis), Nesselsucht (Urtikaria), allergisches Asthma und als gefährlichste Erscheinungsform die Anaphylaxie (anaphylaktischer Schock).

Die auslösenden Allergene der Typ I-Reaktion gehören bis auf wenige Ausnahmen zur Gruppe der Proteine und stammen meist aus unserer natürlichen Umwelt wie z.B. aus Pflanzenpollen, Tierhaaren, Nahrungsmitteln, Milben und Insektengiften. Typisches Merkmal einer Typ I-Allergie ist die Beteiligung von Allergen-spezifischen Immunglobulinen (Antikörpern) der Klasse E (sIgE). Der Nachweis des Allergen-spezifischen IgE ist daher ein wesentlicher Bestandteil der modernen Allergiediagnostik.

VERWENDUNGSZWECK

Der vorliegende sIgE Test ist zur Konzentrationsbestimmung von sIgE in humanem Serum oder Plasma bestimmt und trägt zur Diagnose von Typ I Allergien bei.

TESTPRINZIP

Der Spezifische IgE EAST zur quantitativen Bestimmung von sIgE in humanem Serum und Plasma wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Im ersten Reaktionsschritt werden Patientenproben auf Allergen-beschichteten Scheiben inkubiert. Überschüssige Serum-/Plasmakomponenten werden durch Waschen entfernt. Im nächsten Reaktionsschritt wird anti-IgE Enzymkonjugat in die Kavitäten pipettiert, womit sich festphasengebundenen Allergen/ sIgE/Konjugat-Komplexen bilden. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgt die Zugabe des Substrates p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP), das bei der Anwesenheit von anti-

IgE AP Enzymkonjugat in einen gelben Farbstoff umgewandelt wird. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mittels Natronlauge (NaOH) wird die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes bei 405 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Dabei ist die sIgE-Konzentration in der Patientenprobe direkt proportional zu der ermittelten OD. Als Referenz dienen Kalibratoren mit bekannten IgE-Konzentrationen (kalibriert an WHO75/502). Anhand der ODs der Kalibratoren wird eine Standardkurve generiert, mit deren Hilfe die unbekanntes IgE-Konzentrationen der Proben ermittelt werden können.

KITKOMPONENTEN

Enzymkit	REF	0540200PKL 0541000PKL
Anti-IgE Enzymkonjugat	CONJ AP E	1 x 10,4 mL 1 x 52 mL
Waschpuffer-Konzentrat (50 x)	WASHBUF C 50x	1 x 30 mL 1 x 160 mL
Substratpuffer	SUBBUF	1 x 50 mL 1 x 250 mL
Substratabletten	SUB PNPP	10 x 5 mg 50 x 5 mg
Stopplösung (1 N NaOH)	STOP NAOH	1 x 10 mL 1 x 52 mL

BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

1. Referenzsatz	REF	74000PQ
Anti-IgE Referenzscheiben	CALDISC	2 x 25 Stück
Kalibratoren (0,35; 0,7; 3,5; 17,5 IU/mL)	CAL ⁽¹⁻⁴⁾	4 x 0,8 mL
2. Allergenscheiben	REF	Allergen-code
3. Kontrollen	REF	07001/07002
Positiv Kontrolle	CONTROL +	1 x 0,5 mL
Negativ Kontrolle	CONTROL -	1 x 0,5 mL

LABORBEDARF

10-100 µL, 200-1000 µL Pipetten, Multipette, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße zur Probenvorbereitung, graduierter Messzylinder, ELISA-Reader, Abdeckfolie, Mikrotiterplattenwascher, Inkubator (optional), Laborwecker (Uhr), destilliertes Wasser.

PROBENVORBEREITUNG

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

Nach der Blutabnahme müssen die Proben bei 2-8 °C aufbewahrt und nach Möglichkeit innerhalb von 48 Stunden getestet werden. Ist dies nicht möglich, oder müssen die Proben verschickt werden, sollten die Proben eingefroren werden. 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.

Enzymkonjugat: gebrauchsfertig
Kalibratoren und Kontrollen: gebrauchsfertig
Substratlösung: frisch anzusetzen
Stopplösung: gebrauchsfertig
Waschpufferkonzentrat:

Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:50 verdünnt (Beispiel: für zwei Streifen werden 10 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu 200 µL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser auf 10 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

TESTDURCHFÜHRUNG

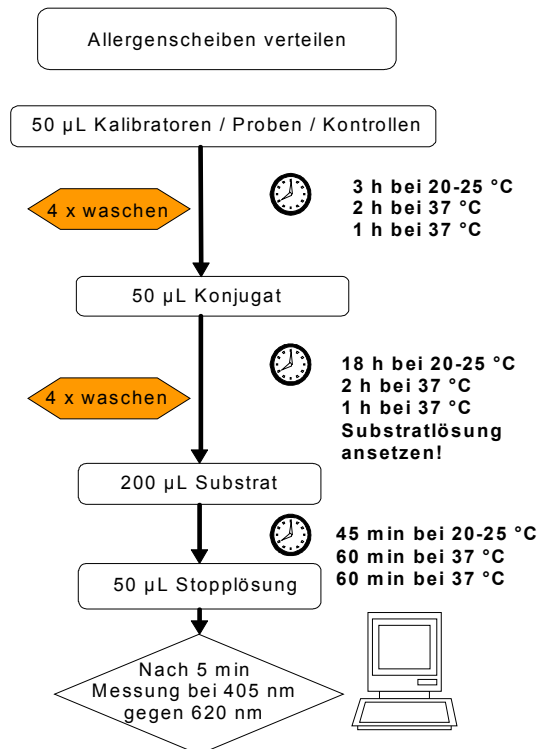
- Zunächst muss ein Testprotokoll erstellt werden. Es wird empfohlen die Kalibratoren und die Kontrollen in Doppelbestimmungen zu messen.
- Referenz- und Allergenscheiben werden mit Hilfe von Plastikpinzetten in die dafür vorgesehenen Kavitäten der Mikrotiterplatte überführt.
- Exakt 50 µL der Kalibratoren-, Kontroll- und Patientenproben direkt auf die entsprechende Allergenscheibe pipettieren. Anschließend die Platte abdecken und gemäß Tabelle 1 inkubieren.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit jede Kavität der Platte mit einem geeigneten ELISA-Washer 4 x mit 1000 µL mit gebrauchsfertigem Waschpuffer im Overflow-Modus waschen.
- Anschließend exakt 50 µL Anti-IgE-Konjugat auf jede Allergenscheibe pipettieren. Danach die Platte erneut abdecken und gemäß Tabelle 1 inkubieren.

- Ungefähr eine Stunde vor dem Gebrauch Substratlösung ansetzen. Dazu eine Tablette pro 5 mL Substratpuffer lösen und im Dunkeln bis zur Verwendung aufbewahren.
- Platte erneut, wie unter Punkt 4 beschrieben, waschen.
- 200 µL Substratlösung in jede Kavität pipettieren und die Platte abgedeckt gemäß Tabelle 1 inkubieren.
- 50 µL Stopplösung/Kavität im Zeittakt wie bei der Substratzugabe pipettieren und mischen. Es empfiehlt sich, die Lösung in den Kavitäten durch leichtes Klopfen gegen den Rahmen der Platte zu mischen. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT wird die Platte bei 405 nm in einem ELISA-Reader gemessen (Referenzwellenlänge 620 nm). Die Konzentrationen der Proben und Kontrollen werden wie auf Seite 3 beschrieben, berechnet.

Tabelle 1: Inkubationsschema

	Testbeschreibung		
	Langtest	Kurztest	Verkürzter Test
Probeninkubation	3 h RT	2 h 37 °C	1 h 37 °C
Konjugatinkubation	18 h RT	2 h 37 °C	1 h 37 °C
Substratinkubation	45 min RT	1 h 37 °C	1 h 37 °C

TESTSCHEMA Spezifisches IgE EAST



DR. FOOKE

Laboratorien GmbH Tel.: 0049 (0)2131-2984-0
 Habichtweg 16 Fax: 0049 (0)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 405 nm – 620 nm] aus den Doppelbestimmungen der Kalibratoren und Kontrollen berechnet. Mit den OD-Mittelwerten der vier Kalibrationen wird eine Standardkurve auf halb-logarithmischem Papier konstruiert (Abszisse: log IU IgE/mL; Ordinate: lineare OD Δ 405 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. Anhand dieser Standardkurve werden die RAST-Klassen der Patientenproben wie folgt ermittelt und das Ergebnis interpretiert:

Klasse	IU/mL IgE	Interpretation
4	> 17,5	stark positiv
3	3,50 - 17,50	deutlich positiv
2	0,70 - 3,50	mäßig positiv
1	0,35 - 0,70	niedrig
0	< 0,35	nicht nachweisbar

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE

Die klinische Relevanz eines positiven Befundes variiert zwischen den verschiedenen Allergenen deutlich. Daher wird empfohlen, in jedem Labor die Normbereiche für jedes Allergen selbst zu ermitteln. Die oben aufgelisteten Ergebnisse können als Leitlinie für die eigenen Referenzwerte verwendet werden.

HSA gekoppelte Allergene

Niedrig molekulare Substanzen (Haptene), wie z.B. Penicilline und Isozyanate, sind über ein Protein (humanes Serum Albumin, HSA) an die Papierscheiben gekoppelt. Da in seltenen Fällen auch HSA-bindendes IgE in den Patientenproben enthalten sein kann, muss das IgE gegen HSA für jede Patientenprobe, die auch auf ein HSA gekoppeltes Allergen getestet wird, mitbestimmt werden.

Empfohlene Auswertung: Die IgE Konzentration gegen das HSA-Konjugat (z.B. Penicillin-HSA) wird parallel zum IgE gegen HSA bestimmt. Anschließend wird die IgE Konzentration gegen HSA von der IgE Konzentration gegen das HSA Konjugat subtrahiert und die IU/mL wie oben beschrieben ausgewertet.

Alternative Auswertung:

Das Ergebnis für das Allergen-HSA-Konjugat ergibt sich, indem zunächst der OD-Wert der HSA-Kontrollscheibe mit dem Faktor 2 multipliziert wird.

$$\text{cut off} = \text{OD (HSA-Kontrollscheibe)} \times 2$$

OD Allergen-HSA-Konjugat > cut off: positives Ergebnis.

MESSBEREICH

Dieser ELISA erfasst IgE-Konzentrationen im Bereich von 0,35 - 17,5 IU/mL. Proben, deren IgE-Konzentration über 17,5 IU/mL liegen, sollten verdünnt und erneut getestet werden, um die genaue IgE-Konzentration zu ermitteln.

PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit

1. Intra-Assay Varianz

Serum	Mittelwert [IU/ml]	VK (%)
1 (n=10)	17,45	1,02
2 (n=10)	9,95	8,53
3 (n=12)	13,56	6,05

2. Inter-Assay Varianz

Serum	Mittelwert [IU/ml]	VK (%)
1 (n=16)	17,09	3,84
2 (n=22)	13,22	7,00
3 (n=22)	3,84	8,28

LINEARITÄT

Fünf zufällig ausgewählte Seren zeigen einen linearen Verlauf ($\leq \pm 20\%$) in drei 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.

GRENZEN DER METHODE

Der vorliegende IgE Test weist folgende Grenzen auf:

- Ein negativer Befund schließt eine Allergie vom Sofort-Typ nicht aus
- Das Testergebnis ist stets in Zusammenhang mit der Anamnese und den klinischen Befunden zu sehen

LITERATUR

1. Ishizaka K, Ishizaka T, und 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.
2. Hamilton R: **Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease**, *Ligand Quarterly* 1979, **2**:13-19.
3. Johansson S, Bennich H, Berg T: **The Clinical Significance of IgE**, *Progress in Clin. Immunol* 1972, **1**.
4. Kjellman M: **Immunoglobulin IgE and Atopic Allergy in Childhood**. *Linköping University Medical Dissertations* No 36 1976.
5. Wittig H, Bellot J, Fillippi I, Royal G: **Age-related Serum IgE Levels in Healthy Subjects and in Patients with Allergic Disease**. *J Allergy Clin Immunol* 1980, **66**:305-313.
6. Gleich, G., Averbeck, A., and Swedlund, H.: **Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay**. *J Lab and Clin Med* 77 (1971) 690-698.
7. Arbeitsgruppe der Deutschen Diagnostika Gruppe e.V. (DDG). **Gute Labordiagnostische Praxis GLDP, Konzept einer „Guten Labordiagnostischen Praxis“**. *Clin Lab* 1999, **45**: 569-80.

WICHTIGE HINWEISE

1. Gemäß Art. 1 Abs. 2b 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 (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 und SubBuf verursachen schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden (H314).
14. p-NPP ist gesundheitsschädlich bei Verschlucken (H302). Diethanolamin (in SubBuf) kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition (H373). Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen (P314)
15. Die enthaltenen Konservierungsmittel (Bronidox L) sind giftig für Wasserorganismen, haben aber keine gewässergefährdende Konzentration mehr. Große Mengen Reagenzien sollten vor der Beseitigung mit Wasser verdünnt werden.
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 (RiilBÄK) in ihrer aktuellen Version und auf die „Gute Labordiagnostische Praxis, GLDP“ hin.



DR . FOOKE

Laboratorien GmbH Tel.: 0049 (0)2131-2984-0
 Habichtweg 16 Fax: 0049 (0)2131-2984-184
 4 1 4 6 8 Neuss
 E-mail: information@fooke-labs.de
 Internet: www.fooke-labs.de

Los-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