

Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testarbeit sorgfältig lesen

Spezifisches IgG - ELISA

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

REF 10100PG

 96 Bestimmungen

HINTERGRUND

Antikörper, auch als Immunglobuline (Ig) bezeichnet, spielen eine entscheidende Rolle bei der humoralen Immunantwort gegen körperfremde, infektiöse Agenzien. Darüber hinaus können Ig insbesondere vom IgG Typ gegen in der Regel harmlose Antigene, wie z.B. Inhalations- oder Nahrungsmittelantigene gebildet werden. Ein typisches Krankheitsbild stellt die exogen-allergische Alveolitis dar, die durch eine meist berufliche Exposition gegen Substanzen in der Atemluft ausgelöst wird. Dabei handelt es sich in der Regel um Pilz- und Bakterienbestandteile, aber auch Exkremate, Mehle oder Chemikalien, die als Staub oder Aerosole am Arbeitsplatz eingeatmet werden. Bei der Farmerlunge sind es thermophile Aktinomyzeten aus schimmeligem Heu. Zu den unterschiedlichen Formen zählen Farmerlunge, Malz- und Papierarbeiterlunge und die Vogelhalterlunge. Auch Fischmehl, Sägemehl, Staub aus Pelzen, aber auch Chemikalien sind als Verursacher der Alveolitis bekannt.

VERWENDUNGSZWECK

Der IgG - ELISA Test ist zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgG in humanem Serum oder Plasma gegen Inhalationsantigene bestimmt und trägt somit zur Diagnose der Typ III Reaktion der Lunge bei (z.B. Farmerlunge, Malz- und Papierarbeiterlunge und Vogelhalterlunge).

TESTPRINZIP

Das Testsystem basiert auf dem Prinzip des ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Es erfasst Antigen-spezifische IgG-Antikörper im Serum oder Plasma von Patienten mit einer Allergie vom Typ III (exogen-allergische Alveolitis). Verdünntes Patientenserum oder -plasma wird in Antigen-beschichteten Mikrotiterstreifen inkubiert. Spezifische IgG-Antikörper in der Patientenprobe binden an die an der Oberfläche der Kavitäten gebundenen Antigene. Nach Zugabe von Anti-human-IgG-Alkalische-Phosphatase-(AP)-Enzymkonjugat bildet sich ein festphasengebundener Antigen/IgG/anti-IgG-AP-Komplex. Die Menge des Antikörper-Enzym-Komplexes wird durch Zugabe von p-Nitrophenylphosphat-(pNPP)-Lösung nachgewiesen. Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Natronlauge (NaOH) wird die Extinktion des farbigen Reaktionsproduktes, die der

Konzentration an spezifischem IgG direkt proportional ist, bei 405 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen. Standardseren mit bekannten IgG-Konzentrationen ergeben eine Standardkurve mit deren Hilfe die Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt werden können.

REAGENZIEN

Komponente	Symbol	10100PG
Anti-IgG-Enzymkonjugat	CONJ AP G	1 x 10 mL
Waschpufferkonzentrat C	WASHBUF C 50x	1 x 30 mL
Verdünnungspuffer	DILBUF C	1 x 100 mL
Substratpuffer	SUBBUF	1 x 25 mL
Substratabletten (pNPP)	SUB PNPP	5 Stück
Stopplösung (1 N NaOH)	STOP NAOH	1 x 10 mL

BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

1.Referenzsatz	Symbol	12001PG
Referenz Kavitäten	REFWELL	6 x 8 Kavitäten
Kalibratoren	CAL	5 x 1,0 mL (0,25; 0,83; 2,5; 8,3; 25 U/mL)
Kontrolle hoch	CONTROL H	1 x 1,0 mL
Kontrolle niedrig	CONTROL L	1 x 1,0 mL

2. Antigen-beschichtete Platten	MICROWELL	13-code-G
---------------------------------	------------------	-----------

Sonstiges:

Pipetten: 10 bis 100 µL, 200 bis 1000 µL, Multipette, Röhrenchen zur Verdünnung der Patientenproben, Pipettenspitzen, graduierter Messzylinder, Mikrotiterplattenphotometer, Brutschrank, Abdeckfolie, Laborwecker (Uhr), Mikrotiterplattenwascher (optional)

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

Nicht benötigte Mikrotiterkavitäten sind mit dem Trockensäckchen in der Folie aufzubewahren und diese sorgfältig zu verschließen.

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

Konjugatlösung: Gebrauchsfertig
Kalibratoren, Kontrollen: Gebrauchsfertig
Verdünnungspuffer: Gebrauchsfertig
Stopplösung: Gebrauchsfertig

Substratlösung: Für 20 Bestimmungen wird eine Tablette mit 5 mL Substratpuffer ca. eine Std. vor Gebrauch gelöst und dunkel gelagert.

Waschlösung: Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem Wasser 1:50 verdünnt (Beispiel: für 2 Streifen: 200 µL Waschpufferkonzentrat werden mit destilliertem Wasser auf 10 mL aufgefüllt). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist bei RT eine Woche verwendbar.

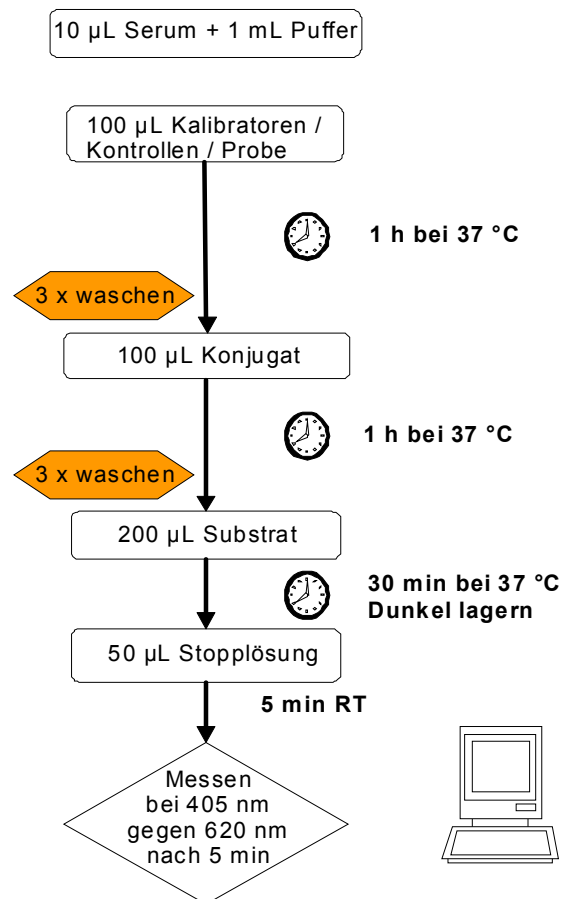
TESTDURCHFÜHRUNG

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 Puffer)
3. Zwei Mikrotiterstreifen des Referenzsatzes und die benötigte Anzahl an antigenbeschichteten Kavitäten in den Rahmen einsetzen. Plastikbeutel anschließend wieder gut verschließen.
4. Je 100 µL der Kalibratoren, Kontrollen und Serumverdünnung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
5. Die Teststreifen abgedeckt 1 h bei 37 °C inkubieren.
6. Nach Ablauf der Inkubationszeit den Inhalt aus den Kavitäten absaugen und 3 x mit mindestens

je 300 µL Waschpuffer/Kavität waschen. Die Waschschrte können manuell oder mit einem geeigneten Mikrotiterplattenwascher (3 x) durchgeführt werden.

7. Je 100 µL Enzymkonjugat in jede Kavität pipettieren und abgedeckt 1 h bei 37 °C inkubieren.
8. Waschen wie unter Punkt 6 beschrieben.
9. 200 µL Substrat-Lösung in jede Kavität einschließlich Substrat-Leerwert pipettieren und die Teststreifen abgedeckt 30 min im Dunklen bei 37 °C inkubieren.
10. 50 µL Stopplösung/Kavität in identischer Reihenfolge und im Zeittakt wie bei der Substratzugabe pipettieren.
11. Zur Homogenisierung der Farblösung 5 min stehen lassen.
12. Bei 405 nm in einem geeigneten, regelmäßig gewarteten ELISA-Reader messen. Referenzwellenlänge 620 nm.

TESTSCHEMA Spezifisches IgG - 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 405 nm – 620 nm] aus den Doppelbestimmungen der Kalibratoren und Kontrollen berechnet. Mit den OD-Mittelwerten der fünf Kalibratoren wird eine Standardkurve auf halblogarithmischem Papier konstruiert (Abszisse: log U slgG/mL; Ordinate: lineare OD Δ 405 nm – 620 nm). Anhand der Standardkurve werden die slgG 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.

MESSBEREICH

Der vorliegende ELISA erfasst IgG-Konzentrationen im Bereich von 0,25 U/mL bis 25 U/mL. Seren mit mehr als 25 U/mL IgG sollten zur genauen Bestimmung des IgG-Gehaltes verdünnt und erneut getestet werden.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

spez. IgG (U/mL)	Interpretation
< 1,0	negativ
1,0 – 2,0	grenzwertig
> 2,0 – 3,5	positiv
> 3,5	stark 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.

ALLERGENRIEGEL MIT KORRESPONDIERENDEN KONTROLLRIEGELN (HSA)

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

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

Alternative Auswertung:

Das Ergebnis für das Antigen-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 Antigen-HSA-Konjugat > cut off: positives Ergebnis.

PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit

1. Intra-Assay

Serum	U/mL	VK (%)
1 (n=10)	178	5,8
2 (n=10)	53	6,6
3 (n=10)	237	7,0

2. Inter-Assay

Serum	U/mL	VK (%)
1 (n=20)	161	13,5
2 (n=20)	58	10,5
3 (n=20)	239	7,7

BEISPIELSTANDARDKURVE

Standardkonzentrationen (U/mL)	Mittelwert OD 405 nm	Referenzbereich OD 405 nm
0,25	0,173	0,200 \pm 0,100
0,83	0,298	0,300 \pm 0,100
2,5	0,661	0,750 \pm 0,150
8,3	1,774	1,800 \pm 0,300
25	2,820	3,000 \pm 0,500

LITERATUR

1. Garcia et al: **Modifications in IgG subclass in the course of immunotherapy with grass pollen.** *J Invest Allergol Clin Immunol* 1993, **3**:19-25.
2. 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**:79-85.
3. Moss RB: **IgG Subclass Antibody Markers in Grass pollen Immunotherapy.** *N Eng Reg Allergy Proc* 1987, **8**:409-415.
4. Nakagawa T: **IgG Subclass Antibodies in Response to House Dust Mite Immunotherapy.** *N Eng Reg Allergy Proc* 1987, **8**:423-428.

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 (RilibÄK) in ihrer aktuellen Version und auf die „Gute Labordiagnostische Praxis, GLDP“ hin.



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

Los- Nummer	CE- Konformitäts- kennzeichnung	<i>In-vitro</i> Diagnos- tikum	Temperatur- begrenzung	Verwen- dbar bis	Bestell- nummer	Gebrauchs- anweisung beachten	Begleit- dokument e beachten	Nicht benut- zen, wenn die Verpackung zerstört ist	Einmal- gebrauch	Inhalt ausrei- chend für <n> Prüfungen	Hergestellt von	Bioge- fährdend