


Gebrauchsanweisung bitte vor Beginn der Testarbeit sorgfältig lesen

Spezifisches IgE REAST

Reverser Enzym Immuno Assay zur quantitativen Bestimmung von spezifischem IgE in humanem Serum oder Plasma mit biotinylierten Allergenen

REF	0520960FL		96 Bestimmungen
REF	0524800FL		480 Bestimmungen
REF	0529600FL		960 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 min 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 Pflanzen-Pollen, Tierhaaren, Nahrungsmitteln, Milben und Insektengiften. Ein charakteristisches Merkmal einer Typ I Allergie ist die Beteiligung von Allergen-spezifischen Immunglobulinen (Antikörpern) der Klasse E (IgE). Der Nachweis von IgE ist daher ein wesentlicher Bestandteil der modernen Allergiediagnostik.

VERWENDUNGSZWECK

Der Spezifisches IgE REAST ist zur Konzentrationsbestimmung von IgE in humanem Serum oder Plasma bestimmt und trägt zur Diagnose von Typ I Allergien bei.

TESTPRINZIP

Der Spezifisches IgE REAST zur quantitativen Bestimmung von IgE in humanem Serum und Plasma wird als „Sandwich ELISA“ in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu sind die einzelnen Kavitäten mit Anti-human-IgE beschichtet, wodurch in einem ersten Inkubationsschritt die Gesamt-IgE Fraktion aus der Patientenprobe gebunden wird. Überschüssige Serum-/Plasmakomponenten werden durch Waschen entfernt. Im nächsten Reaktionsschritt werden die entsprechenden biotinylierten Allergene in den Kavitäten der Mikrotiterplatten inkubiert. Nach einem erneuten Waschzyklus erfolgt die Detektion des spezifisch gebundenen Allergens über ein Streptavidin/Peroxidase (HRP)-Konjugat unter Bildung festphasengebundener IgE/biotinyliertes Allergen/Konjugat-Komplexe. Nach einem erneuten Waschschritt 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. Anschließend wird die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen.

Dabei ist die IgE-Konzentration in der Patientenprobe 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 unbekannt IgE-Konzentrationen der Proben ermittelt werden können.

KIT KOMPONENTEN

Enzymkit	REF	0520960FL 0524800FL 0529600FL
Mikrotiterstreifen, anti-IgE beschichtet	MICROWELL	1 Platte 5 Platten 10 Platten
Streptavidin HRP-Konjugat	CONJ HRP STREP	1 x 16 mL 1 x 55 mL 2 x 55 mL
Waschpuffer-Konzentrat (25x)	WASHBUF B 25x	1 x 50 mL 1 x 110 mL 1 x 250 mL
TMB Substrat	SUB TMB	1 x 16 mL 1 x 55 mL 2 x 55 mL
Stopplösung (0,5 M H ₂ SO ₄)	STOP H₂SO₄	1 x 16 mL 1 x 55 mL 2 x 55 mL

BENÖTIGTES, JEDOCH NICHT IM KIT ENTHALTENES MATERIAL

1. Referenzsatz	REF	07050FL
Anti-IgE Biotin Konjugat	BIOTIN AB E	1 x 10 mL
Kalibratoren (0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50; 100 IU/mL)	CAL (1-6)	6 x 1,5 mL

2. Biotinylierte Allergene	REF	Allergen code + FL
-----------------------------------	------------	---------------------------

3. Kontrollen	REF	07005/07006
Positiv Kontrolle	CONTROL +	1 x 1 mL
Negativ Kontrolle	CONTROL -	1 x 1 mL

Sonstiges: 10-100 µL, 200-1000 µL Pipetten, Multi-
 pipette, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße zur Probenvor-
 bereitung, graduierter Messzylinder, Mikrotiterplatten-
 photometer, Abdeckfolie, Mikrotiterplattenwascher
 (optional), Laborwecker (Uhr), destilliertes Wasser.

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.
 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
 zusammen mit dem Trockensäckchen im sorgfältig ver-
 schlossenen Aluminiumbeutel aufzubewahren.

Substratlösung: gebrauchsfertig
Stopplösung: gebrauchsfertig
Kalibratoren und Kontrollen: gebrauchsfertig
Enzymkonjugat: gebrauchsfertig
Anti-IgE Biotin gebrauchsfertig

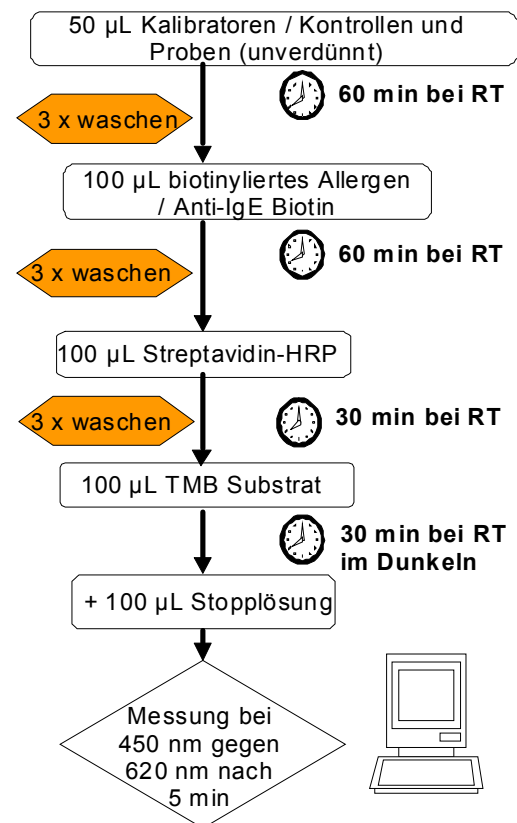
Waschpufferkonzentrat:
 Das Waschpufferkonzentrat wird mit destilliertem
 Wasser 1:25 verdünnt (Beispiel: für zwei Streifen
 werden 50 mL Waschpuffer benötigt. Füllen Sie dazu
 2 mL Waschpufferkonzentrat mit destilliertem Wasser
 auf 50 mL auf). Die gebrauchsfertige Waschlösung ist
 bei RT eine Woche verwendbar.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Zunächst sollte ein Testprotokoll erstellt werden. Es
 wird empfohlen, die Kalibratoren und die Kontrollen
 sowie die Patientenproben in Doppelbestimmungen
 zu messen.
2. Benötigte anti-IgE beschichtete Kavitäten in einen
 Rahmen einsetzen. Aluminiumbeutel mit ver-
 bleibenden Streifen und Trockensäckchen
 anschließend wieder gut verschließen.
3. 50 µL unverdünnte Patientenproben, Kalibratoren
 und Kontrollen in die dafür vorgesehenen Anti-IgE-
 beschichteten Kavitäten pipettieren.
4. Die Platte abdecken und 60 min bei RT (20-25°C)
 inkubieren.
5. Die Kavitäten werden anschließend in drei Wasch-
 zyklen mit je 500 µL Waschlösung pro Kavität
 manuell oder mit einem geeigneten Wascherät
 (overflow) gewaschen. Restflüssigkeit durch Aus-
 klopfen entfernen.
6. 100 µL der entsprechenden Allergenlösung (für
 Patientenproben und Kontrollen) und des anti-IgE
 Biotin Konjugates (für Kalibratoren) gemäß des
 Pipettierschemas in Kavitäten pipettieren. Die
 Platte abdecken und 60 min bei RT inkubieren.
7. Platte erneut, wie unter Punkt 5 beschrieben,
 waschen.

8. 100 µL Streptavidin-HRP Konjugat in jede Kavität
 pipettieren und die Platte abgedeckt
 30 min bei RT inkubieren.
9. Platte erneut, wie unter Punkt 5 beschrieben,
 waschen.
10. 100 µL TMB Substrat in jede Kavität pipettieren und
 die Platte abgedeckt 30 min bei RT im Dunkeln
 inkubieren.
11. 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
 bei 450 nm in einem geeigneten ELISA-Reader
 messen (Referenzwellenlänge 620 nm). Die Kon-
 zentrationen der Proben und Kontrollen werden wie
 auf Seite 3 beschrieben berechnet.

TESTSCHEMA SPEZIFISCHES IgE REAST Manuelle Abarbeitung



Für Automaten gelten gerätespezifische Einstellungen.



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

Es werden die Mittelwerte der ODs [Δ 450 nm - 620 nm] aus den Doppelbestimmungen der Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben berechnet. Mit den OD-Mittelwerten der Kalibratoren wird eine Standardkurve auf halblogarithmischen Papier konstruiert (Abszisse: log IU IgE/mL; Ordinate: lineare OD Δ 450 nm - 620 nm). Anhand der Standardkurve werden die sIgE Konzentrationen der jeweiligen Patientenprobe und der Kontrollen durch Einsetzen des OD-Mittelwertes 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
0,35	0,106	0,074 - 0,138
0,7	0,161	0,113 - 0,209
3,5	0,568	0,398 - 0,738
17,5	1,619	1,133 - 2,105
50	2,558	1,791 - 3,325
100	3,015	2,111 - 3,920

AUSWERTUNG

Die anhand der Standardkurve ermittelten internationalen Einheiten (IU) und/oder REAST-Klassen der Patientenproben sind wie folgt zu bewerten:

Klasse	IU/mL	spez. IgE-Konz.
6	> 100	extrem positiv
5	50 - 100	sehr stark positiv
4	17,5 - 50	stark positiv
3	3,5 - 17,5	deutlich positiv
2	0,7 - 3,5	mäßig positiv
1	0,35 - 0,7	niedrig
0	< 0,35	nicht nachweisbar

ZU ERWARTENDE ERGEBNISSE

Die klinische Relevanz eines positiven Befundes variiert zwischen den verschiedenen Allergenen sehr deutlich. Daher wird empfohlen, in jedem Labor die Normbereiche für jedes Allergen 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.

MESSBEREICH

Dieser ELISA erfasst sIgE-Konzentrationen im Bereich von 0,35 bis 100 IU/mL. Proben, deren sIgE-Konzentration über 100 IU/mL liegen, sollten verdünnt

und erneut getestet werden, um die genaue sIgE-Konzentration zu ermitteln.

PRÄZISION

Varianz und Reproduzierbarkeit

1. Intra-Assay Varianz

SERUM	Mittelwert IU/mL	VK (%)
1 (n=10)	8,6	2,0
2 (n=7)	94,6	6,6

2. Inter-Assay Varianz

SERUM	Mittelwert IU/mL	VK (%)
1 (n=20)	8,5	3,8
2 (n=16)	95,8	6,7

LINEARITÄT

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

SPEZIFITÄT

Der Spezifische IgE REAST detektiert spezifisch humanes sIgE. In physiologischen Konzentrationen konnte keine Kreuzreaktivität mit anderen Ig-Klassen wie IgA, IgD, IgM und IgG nachgewiesen werden.

GRENZEN DER METHODE

Der Spezifische IgE REAST weist folgende Grenzen auf:

- Ein negativer Befund schließt eine Allergie vom Sofort-Typ nicht aus
- Das Testergebnis ist stets in Zusammenhang mit der Anamnese zu sehen
- Bei Proben mit sehr hohen Total IgE-Konzentrationen (> 1000 IU/mL) können die gemessenen spezifischen IgE Werte unter den tatsächlichen Werten liegen.
- Testungen mit Allergenmischungen ermöglichen nur eine semi-quantitative Auswertung.

LITERATUR

1. Johansson S, Bennich H and Berg T: **The Clinical Significance of IgE.** *Progress in Clin Immunol*, 1972, 1.
2. Kjellman M: **Immunoglobulin IgE and Atopic Allergy in Childhood.** *Linköping University Medical Dissertations* No 36 (1976).
3. Kleine-Tebbe J, Breuer K, Lepp U, Vieths S, Worm M, Kunkel G, Wahn U und Lau S: **Spezifische IgE-Werte gegen Aero- und Nahrungsmittelallergene im Vergleich: Dr. Fooke ALLERG-O-LIQ und Pharmacia CAP-System.** *Allergologie* 2004, 4:129-134.
4. Arbeitsgruppe der Deutschen Diagnostika Gruppe e.V. (DDG): **Gute Labordiagnostische Praxis GLDP, Konzept einer „Guten Labordiagnostischen Praxis“.** *Clin Lab* 1999, 45:569-580.
5. Sun B, Mahler M, Mei J, Jing L, Zhong N: **Allergen-specific IgE to inhalant and food allergens and total IgE values in China – Comparison between two commercial immunoassays: Dr. Fooke ALLERG-O-LIQ versus Phadia ImmunoCAP® System.** *J Invest All Clin Immunol* 2008, 18:319-321.

WICHTIGE HINWEISE

- 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.
- 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.
- Das Produkt darf nur von geschultem Fachpersonal angewendet werden. Schwangere sollten den Test nicht durchführen.
- Verwendete Geräte sind gemäß den Herstellerangaben regelmäßig zu warten und vor ihrem Gebrauch auf ihre Funktionsfähigkeit zu überprüfen.
- 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.
- 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.
- 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.
- Die Waschprozedur ist von entscheidender Bedeutung. Unzureichendes Waschen führt zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Verwendung von Multi- bzw. Mehrkanalpipetten und automatischen Washern wird empfohlen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren. Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- 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.
- 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.
- 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.
- Stopplösung verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden (H314).
- Möglicherweise ist TMB in hohen Konzentrationen potentiell mutagen. Aufgrund der geringen Konzentration von TMB in der Substratlösung ist eine mutagene Wirkung bei ordnungsgemäßem Gebrauch ausgeschlossen.
- 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).
- 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.
- 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