

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Total IgE ELISA



DEIGE02



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TEST	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS	4
5. REAGENTS PROVIDED	5
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	8
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS	11
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	14
11. GARANTIE	14
12. LITERATUR.....	15
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Total IgE ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of total IgE antibodies in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of Demeditec. This assay is intended for in-vitro diagnostic use only. Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

The existence of IgE in man as a unique class of immunoglobulins which are important in the mediation of the allergic response has been known for over twenty years. The mechanism of action involves an initial antigenic stimulation of immunocompetent B lymphocytes by a specific antigen, a process which induces the lymphocyte to respond by producing specific antibody of several classes.

One class, reaginic or IgE antibody, becomes partially bound via its Fc portion to receptors on the surface of mast cells and basophilic leukocytes. Upon further stimulation by specific allergens, these cell-bound IgE molecules bind via their Fab portion to the allergen. This combination triggers the mast cells and basophilic leukocytes to release various vasoactive amines into the blood and the surrounding tissue. These substances cause smooth muscle constriction and lead ultimately to allergic conditions such as wheal and flare reactions, hives, dermatitis, rhinitis, hay fever, asthma and anaphylactic shock.

IgE determinations are most valuable in the diagnostic assessment of patients with established or suspected allergic disease. In normal subjects, IgE values are related to age, with normal values peaking around 10 - 14 years. Infants and children with family history of atopic allergy are at increased risk of developing disease and constitute a prime population for screening. Studies have shown that conditions such as asthma, rhinitis, eczema, urticaria, dermatitis and some parasitic infections lead to increased IgE levels. Asthma, hay fever and atopic eczema patients may produce levels 3 - 10 times those of normal patients.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The Total IgE ELISA is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). A monoclonal mouse-anti-human IgE antibody is bound on the surface of the microtiter strips. Undiluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate together with anti-human-IgE-peroxidase conjugate. A sandwich complex between the serum IgE and the two antibodies develops. After a 30 minutes' incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 15 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The colour development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the colour from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of the IgE antibodies is directly proportional to the intensity of the colour.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- No reagents from different kit lots have to be used, and they should not be mixed with one another.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Symbol	Components	Volume / Qty.
SORB MT	Monoclonal anti-IgE coated microtiter strips	12
CAL A - F	Calibrators (Standards) (0, 5, 25, 100, 250, 1000 IU/mL)	1x 1 mL; 5x 200 µL
ENZ CONJ	Enzyme Conjugate (goat anti-IgE-HRP)	22 mL
SUB TMB	Substrate	12 mL
STOP SOLN	Stop Solution	12 mL
WASH SOLN 10x	Washing Buffer (10x)	60 mL

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Microtiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with mouse monoclonal anti-IgE. Ready-to-use.

5.2. Calibrators (Standards)

1 mL (0 IU/mL), 5x 200 µL (5, 25, 100, 250, 1000 IU/mL), human serum diluted with PBS. Calibrated against the 3rd International Standard 11/234. Addition of 0.1% sodium azide. Ready-to-use.

5.3. Enzyme Conjugate

22 mL, goat anti-human-IgE-HRP, in protein-containing buffer solution. Ready-to-use.

5.4. Substrate

12 mL, TMB (tetramethylbenzidin). Ready-to-use.

5.5. Stop Solution

12 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.6. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 10 µL-, 200 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Bidistilled water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)
- Plastic Bag

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (4-8°C) for up to 48 hours, for a longer storage they should be kept at -20 °C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results. For the performance of the test the samples and the standards have to be used undiluted.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with distilled water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- Standards and samples should be assayed in duplicates.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 4-8°C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards and samples in duplicate as well as for a substrate blank.
2. Pipet 10 µL each of the **undiluted** samples and the **ready-to-use** standards together with 200 µL of conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Residuals of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 15 minutes in the dark (e.g. drawer).
7. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
8. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

9.1. Quantification

The mean values for the measured absorptions are calculated after subtraction of the substrate blank value. The difference between the single values should not exceed 10%. Example:

	OD Value	corrected OD	Mean OD Value
Substrate Blank	0,015		
Standard 0 IU/mL	0.030 / 0.036	0.015 / 0.021	0.018
Standard 5 IU/mL	0.070 / 0.054	0.055 / 0.039	0.047
Standard 25 IU/mL	0.162 / 0.148	0.147 / 0.133	0.140
Standard 100 IU/mL	0.646 / 0.604	0.631 / 0.589	0.610
Standard 250 IU/mL	0.974 / 1.014	0.959 / 0.999	0.979
Standard 1000 IU/mL	2.007 / 1.867	1.992 / 1.852	1.922

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

The ready to use calibrators of the Total IgE ELISA are defined and expressed in International Units (IU). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. For a quantitative evaluation the absorptions of the standards are graphically drawn against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. Alternatively the use of electronic device is possible. The results can also be calculated with normal programs for automatic data processing, i.e. 4 parameter, spline, logit-log. Any sample reading greater than the highest standard should be diluted appropriately with zero standard and reassayed. The result has to be multiplied by the dilution factor. Do not use the above calibration curve. In the laboratory the standard curve should be established in each assay run.

9.2. Result Interpretation

Normal ranges of Total IgE are dependent on age:

Age	Normal Range [IU/mL]
Newborns	< 1.2
1 – 6 months	< 7.2
7 – 12 months	< 12.7
1 – 5 years	< 60
6 – 9 years	< 155
10 – 15 years	< 199
Adults (Greyzone)	<100 (60-100)

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Total Immunoglobulin E ELISA	
Intra-Assay-Precision	5.1 %
Inter-Assay-Precision	4.1 %
Inter-Lot-Precision	1.3 – 5.9 %
Analytical Sensitivity	0.8 IU/mL
Recovery	87 – 97 %
Linearity	95 – 126 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to Immunoglobulin G
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL
Clinical Specificity	100 %
Clinical Sensitivity	100 %
Measuring Range	5 – 1000 IU/mL

11. REFERENCES

1. 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. Imm.*, 97: 75 (1966).
2. Hamilton R. Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease. *Ligand Quarterly*, 2: 13 (1979).
3. Johansson S, Bennich H, Berg T. The Clinical Significance of IgE. *Progress in Clin. Immunology*, 1: (1972).
4. Kjellmann M. Immunoglobulin E and Atopic Allergy in Childhood. Linköping University Medical Dissertations, Nr. 36, (1976).
5. Wittig H, Bellott J, Fillippi I, Royal G. Age-Related Serum IgE Levels in Health Subjects and in Patients with Allergic Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 66: 305 (1980).
6. Gleich G, Averbeck A, Swedlund H. Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay. *J. Lab. and Clin. Med.*, 77: 690 (1971).

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Gesamt IgE ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgE Antikörpern im Serum oder Plasma. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Bei Patienten mit atopischen allergischen Erkrankungen wie Asthma, Dermatitis und Heuschnupfen wurden erhöhte Spiegel an Gesamt-IgE (Immunglobulin E) im Serum festgestellt. IgE ist auch als der Reagin-Antikörper bekannt. Hohe IgE-Konzentrationen sind im allgemeinen ein Hinweis auf eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeit, die zu allergischen Reaktionen führt. Infektionen mit Parasiten und bestimmte klinische Krankheitsbilder, z.B. Aspergillose, können auch zu erhöhten IgE-Spiegeln führen. Erniedrigte Konzentrationen von IgE werden in Fällen von Hypogammaglobulinämie, Autoimmunkrankheiten, Colitis ulcerosa, Hepatitis, Krebs und Malaria gefunden. IgE-Bestimmungen in Nabelschnurblut haben einen prognostischen Wert bei der Abschätzung des zukünftigen Allergierisikos bei Neugeborenen. Bestimmte Gruppen von weißen Blutzellen, vor allem Basophile und Gewebe-Mastzellen, besitzen Membranrezeptoren für das IgE-Molekül. Diese Zielzellen führen über eine Reihe von komplexen Reaktionen zu einer Verbindung des spezifischen Allergens mit durch Antikörper sensibilisierte Basophile oder Mastzellen und verursachen die Freisetzung von bestimmten vasoaktiven Stoffen wie z.B. Histamin in den Blutkreislauf. Als Ergebnis dieser biochemischen Mediatoren erfolgt eine Zusammenziehung der glatten Muskulatur, eine Aufweitung der kapillären Blutgefäße, eine Aktivierung der Thrombozyten sowie eine Reizung der Nervenendigungen in der Haut, wie es charakteristisch für allergische Reaktionen ist. Typische klinische Symptome der unmittelbaren Überempfindlichkeit sind Entzündungen und Juckreiz im Falle der Hautreaktionen, Verstopfungen oder bronchiale Reaktionen. Die IgE Serumkonzentration bei einem bestimmten Patienten hängt sowohl von dem Ausmaß der allergischen Reaktion, als auch von der Anzahl der verschiedenen Allergene ab, gegen die er sensibilisiert ist. Nichtallergische gesunde Menschen zeigen IgE-Konzentrationen, die über einen weiten Bereich streuen und während der Kindheit ständig zunehmen, wobei die höchsten Werte im Alter von 15 bis 20 Jahren erreicht werden. Danach bleiben die IgE-Konzentrationen bis zum Alter von etwa 60 Jahren konstant, wonach sie wieder langsam abnehmen. Die in diesem Kit enthaltenen IgE Standards sind auf das internationale Referenzpräparat (3rd International Standard 11/234) eingestellt worden, so dass die Ergebnisse in IU/mL berechnet werden können.

3. TESTPRINZIP

Der Gesamt-IgE-Testkit basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist ein monoklonales Anti-IgE gebunden. Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden zusammen mit dem gebrauchsfertigen Konjugat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es bildet sich ein sandwichartiger Komplex zwischen den IgE Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Antikörper bzw. dem Anti-IgE-Peroxidase Konjugat. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 15 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgE Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natriumhypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Es dürfen keine Reagenzien von verschiedenen Kitchargen verwendet und diese nicht miteinander vermischt werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
SORB MT	Anti-IgE (monoklonal) beschichtete Mikrotiterstreifen	12
CAL A - F	Standards (0, 5, 25, 100, 250 und 1000 IU/mL IgE)	1x 1 mL; 5x 200 µL
ENZ CONJ	Anti-human-IgE-Enzymkonjugat	22 mL
SUB TMB	Substratlösung	15 mL
STOP SOLN	Stopp-Lösung	15 mL
WASH SOLN 10x	Waschpuffer (10x)	60 mL

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit monoklonalem Anti-IgE. Gebrauchsfertig.

5.2. Standards

6 x 200 µL menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit 0, 5, 25, 100, 250 und 1000 IU/mL IgE an Antikörpern. Kalibriert gegen 3rd International Standard 11/234. Zusatz von 0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.3. Anti-human-IgE-Enzymkonjugat

22 mL, Ziege-a-human-IgE-HRP, in proteinhaltiger Pufferlösung. Gebrauchsfertig.

5.4. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.5. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.6. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37 °C) erwärmen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)
- Plastikbeutel

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 2 Tagen gekühlt (4-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Es wird empfohlen, Doppelbestimmungen durchzuführen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards, die Proben und die Kontrollen im Doppelansatz sowie für einen Substrat-Leerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 10 µl der Proben, Standards bzw. Kontrollen zusammen mit 200 µl Konjugat in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µl endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Wasch-pufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µl des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schub-lade) 15 Minuten inkubieren.
7. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µl der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
8. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (eventuell Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

9.1. Quantitative Auswertung

Es werden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen jeweils nach Abzug des Substrat-Leerwerts berechnet. Die Abweichung zwischen den Einzelwerten sollte unter 10 % liegen.

Beispiel

	OD Wert	korrigierte OD	gemittelte OD
Substratleerwert	0,015		
Standard 0 IU/mL	0,030 / 0,036	0,015 / 0,021	0,018
Standard 5 IU/mL	0,070 / 0,054	0,055 / 0,039	0,047
Standard 25 IU/mL	0,162 / 0,148	0,147 / 0,133	0,140
Standard 100 IU/mL	0,646 / 0,604	0,631 / 0,589	0,610
Standard 250 IU/mL	0,974 / 1,014	0,959 / 0,999	0,979
Standard 1000 IU/mL	2,007 / 1,867	1,992 / 1,852	1,922

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Gesamt-IgE Kits sind auf internationale WHO-Units (IU/ml) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards gegen ihre Konzentrationen graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden.

9.2. Interpretation

Der Referenzbereich des Gesamt IgE Tests hängt vom Alter ab:

Alter	Referenzbereich [IU/mL]
Neugeborene	< 1,2
1 – 6 Monate	< 7,2
7 – 12 Monate	< 12,7
1 – 5 Jahre	< 60
6 – 9 Jahre	< 155
10 – 15 Jahre	< 199
Erwachsene (grenzw. Bereich)	<100 (60-100)

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Gesamt IgE ELISA	
Intra-Assay-Präzision	5,1 %
Inter-Assay-Präzision	4,1 %
Inter-Lot-Präzision	1,3 – 5,9 %
Analytische Sensitivität	0,8 IU/mL
Wiederfindung	87 – 97 %
Linearität	95 – 126 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen Immunglobulin G
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	100 %
Klinische Sensitivität	100 %
Messbereich	5 – 1000 IU/mL














11. GARANTIE

Die Testkomponenten sind sorgfältig aufeinander abgestimmt und qualitätskontrolliert. Im Fall des Austausches von Komponenten unterschiedlicher Chargen garantiert der Hersteller nicht für die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse. Die Chargen-Nr. der einzelnen Komponenten ist auf den Etiketten angegeben.

12. LITERATUR

1. Aas K: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. *Clinical Allergy* 1978; 8:39-50.
2. AMA Council on Scientific Affairs, In Vitro Testing for Allergy. Report II of the Allergy Panel Council on Scientific Affairs. *JAMA*, 1987, 258(12):1639-43.
3. AMA Council on Scientific Affairs, In Vivo Diagnostic Testing and Immunotherapy for Allergy. Part I, *JAMA*, 1987, 258:1363-7.
4. Bleumink E: Food Allergy; the chemical nature of the substance eliciting symptoms. *World Reviews in Nutrition and Diet* 1970; 12:505-570.
5. Canadian Paediatric Society, Allergy Section. Blood Tests for Allergy in Children. *Can Med Assoc J*, 1990, 142(11):1207-8.
6. Ishizaka K, et al.: Physio-chemical properties of human reaginic antibody. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *Journal of Immunology*, V97,75(1966).
7. Johansson SGO, Bennich H: Immunological studies of an atypical myeloma immunoglobulin. *Immunology* 13(1967)381.
8. Lichtenstein G, et al.: IgE antibody measurements in ragweed hay fever, relationships to clinical severity and the results of immunotherapy. *J. Clinical Investigation* 1973; 52:472-482.
9. Lichtenstein G, et al.: Insect allergy. The state of the art. *J. Allergy and Clinical Immunology* 1979; 64:5-12.
10. Lowenstein H: Cross reactions among pollen antigens. *Allergy* 1980; 35:198-200.
11. Nalebuff DJ and Fadal RG: RAST-Based Immunotherapy. *Rhinology*, 1984, 22:11-9.
12. Ownby DR: Allergy Testing: In Vitro Versus In Vivo. *Pediatr Clin North Am*, 1988, 35:995-1009.
13. Peters T, Westgard JO: Evaluation of methods, Chapter 7 in: Tietz NW, editor. *Fundamentals of clinical chemistry*, Third Edition, Philadelphia: Saunders. 1987: 225-37.
14. Shearer WT: Specific Diagnostic Modalities: IgE, Skin Tests, and RAST. *J Allergy Clin Immunol*, 1989, 84(6 Pt2):1112-6.
15. Smith T: Allergy testing in clinical practice. *Annals of Allergy* 1992; 68:293-300.
16. Vadlamudi SK, Stewart WD, Fugate KJ, and Tsakeris TM: Performance characteristics for an immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51:134-138.
17. Van Arsdell PP Jr and Larson EB: Diagnostic Tests for Patients With Suspected Allergic Disease. *Ann Intern Med*, 1989, 110(4):304-12.
18. Williams PB, et al.: Comparison of skin testing and three in-vitro assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity. *Annals of Allergy* 1992; 68:35-45.
19. Yunginger JW: Allergens: Recent Advances. *Pediatr Clin North Am*, 1988, 35:981-93.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta