



AllergenP Total IgE



96

PA 1002



REAGENTI DEL KIT - KIT REAGENTS - KITREAGENZIIEN

Reagenti / Reagents / Reagenzien	Quantità/ Quantity/ Menge	
MP	1 x 96	Pronta per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
0-5 CAL	6 x 0,5 mL	Pronti per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ E1	1 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ E2	1 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
BUF AS	1 x 18 mL	Pronti per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
DIL	1 x 10 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
SUBS	1 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
WASH 20X	1 x 50 mL	Concentrata 20X / 20X Concentrated / 20x konzentriert
STOP	1 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig

DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE IMMUNOGLOBULINE E TOTALI (IgE) NEL SIERO UMANO.

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO
SOLO PER USO PROFESSIONALE**

1. APPLICAZIONI CLINICHE

Normalmente la concentrazione di IgE nel siero é molto bassa: aumenta gradualmente dalla nascita fino all'adolescenza. Negli adulti la concentrazione normale di IgE può raggiungere le 100 UI/mL. Nelle persone anziane il livello di IgE a volte diminuisce.

La produzione di IgE é essenziale nella immunità anti-elmintica. Nei casi di ascariasi si osserva un incremento di 15-20 volte nella concentrazione di IgE. Tuttavia nei paesi industrializzati il rilevamento di alte concentrazioni di IgE é principalmente connesso con le patologie allergiche. La determinazione quantitativa di IgE totali ha un grande valore prognostico. Nel 75% dei bambini nati da genitori con malattie allergiche la concentrazione sierica di IgE é >95%, rispetto al limite superiore del range di normalità per la fascia di età corrispondente. Il rilevamento di alte concentrazioni di IgE nel siero, tramite il test immunoenzimatico, é uno strumento importante per la differenziazione tra malattie allergiche ed altre patologie con simili manifestazioni cliniche (come l'asma, frequenti malattie respiratorie, rinite cronica e dermatiti).

Un aumento della concentrazione di IgE totali nel siero é stata riportata anche in pazienti affetti da linfosarcoma e dalla sindrome da iper-IgE.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il metodo impiegato nell' **AllergenP Total IgE** si basa sul sistema immunoenzimatico a cattura ed utilizza la stessa fase solida (pozzetti di microstrip sensibilizzati con anticorpi anti-IgE umane) per tutti i test con i diversi allergeni e per le curve di calibrazione. I calibratori vengono dispensati nei pozzetti delle prime strip, mentre i campioni vengono dispensati nei restanti pozzetti. Durante la prima incubazione gli anticorpi anti-IgE immobilizzati sulla fase solida (Fig.1 - MAT1) catturano le IgE del campione.

Dopo un primo lavaggio, teso ad eliminare qualsiasi possibile interferenza di eventuali altre immunoglobuline (per es.: IgG allergene-specifiche), viene aggiunto il coniugato anti-IgE-Biotina. Durante questa seconda incubazione il coniugato anti-IgE-Biotina si lega alle IgE dei calibratori, catturate sul pozzetto,

per formare il "sandwich" fase solida || -anti-IgE : IgE : anti-IgE-Biotina (Fig. 1 - MAT2).

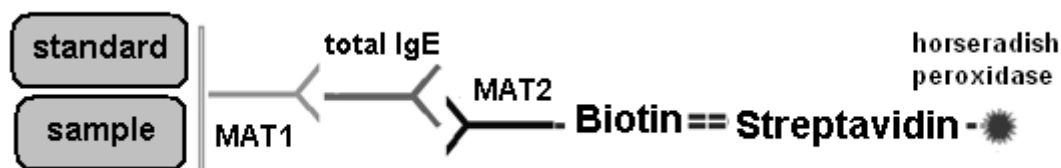


Figure 1. Schema di reazione

Dopo il lavaggio si aggiunge il Coniugato Streptavidina-Perossidasi in tutti i pozzetti. Questo reagisce con il coniugato anti-IgE-Biotina, rimasto legato nei pozzetti dei calibratori e nei pozzetti dei campioni.

L'ultimo lavaggio consente di eliminare il materiale non legato. infine, l'aggiunta della TMB permette la rilevazione del coniugato Streptavidina-Perossidasi rimasto legato all'immunocomplesso finale in fase solida. L'intensità del colore che si sviluppa è direttamente proporzionale alla concentrazione delle IgE nei campioni o calibratori. La concentrazione di IgE nel campione del paziente viene letta da una curva standard, elaborata in ogni dosaggio. I risultati sono ottenuti per interpolazione sulla curva di calibrazione e sono espressi sia in termini di unità.

3. CONTENUTO DEL KIT

MP	Micropiastra: 1 micropiastra da 12 strip, ciascuna composta da 8 pozzetti separabili (totale 96 pozzetti) rivestiti con anticorpi monoclonali anti-igE.
0-5 CAL	Calibratori IgE: 6 flaconi da 0.5 mL ciascuno, contenenti una soluzione a base di proteine a concentrazioni note di IgE: 0 -10 - 50 - 250 - 500 - 1000 UI/mL . Per le esatte concentrazioni di IgE vedere le etichette dei flaconi. Conservante: Kathon 0.015%. Pronti per l'uso.
CONJ E1	Coniugato E1: 1 flacone da 13 mL di soluzione contenente anticorpi monoclonali anti-igE coniugati con Biotina. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
CONJ E2	Coniugato E2: 1 flacone da 13 mL di soluzione contenente streptavidina coniugata con HRP. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
BUF AS	Tampone di Dosaggio: 1 flacone da 18 mL di soluzione salina. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
DIL	Diluyente campioni: 1 flacone da 10 mL di soluzione a base di proteine. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.

WASH 20X	Soluzione Lavaggio: 1 flacone da 50 mL di tensioattivo in soluzione salina tamponata, sufficiente per preparare 1000 mL di soluzione. Concentrata 20X.
SUBS	Soluzione TMB: 1 flacone da 13 mL di soluzione 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina in tampone citrato contenente perossido di idrogeno. Pronto per l'uso.
STOP	Reagente Bloccante: 1 flacone da 13 mL di soluzione HCl 1N. Pronto per l'uso.

3.1 Preparazione dei reagenti

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente, quindi agitare accuratamente.

MP Mantenere la **Micropiastra** a temperatura ambiente (18-25°C) per almeno 30 minuti prima di aprire il sacchetto. Aprire il sacchetto ed inserire il numero necessario di strip nell'apposito alloggiamento. Riporre le strip inutilizzate nella busta richiudibile con minigrip e richiudere debitamente.

CAL **Calibratori IgE:** i Calibratori sono liquidi e pronti per l'uso.

CONJ E1 **Coniugato E1:** è pronto per l'uso. Trasferire il Coniugato nella vaschetta di contenimento considerando un volume di **1.15 mL** per strip.

CONJ E2 **Coniugato E2:** è pronto per l'uso. Trasferire il Coniugato nella vaschetta di contenimento considerando un volume di **1.15 mL** per strip.

WASH 20X Preparare il volume richiesto di **Soluzione Lavaggio** diluendo il concentrato 20 volte con acqua distillata o deionizzata. Per esempio:

5 mL di **WASH 20X** + 95 mL di distillata acqua

Mescolare accuratamente, evitando la formazione di schiuma. Mantenere ben chiusa la soluzione di lavaggio preparata.

SUBS **Soluzione TMB:** è pronta per l'uso. Trasferire la Soluzione TMB nella vaschetta di contenimento, direttamente al momento della dispensazione, considerando un volume di **1.15 mL** per strip. Proteggere la Soluzione TMB dalla luce diretta.

STOP **Reagente Bloccante:** è pronto per l'uso. Trasferire il Reagente Bloccante nella vaschetta di contenimento, al momento della dispensazione, considerando un volume di **1.15 mL** per strip.

BUF AS **Tampone di Dosaggio:** è pronto per l'uso. Trasferire il Tampone nella vaschetta di contenimento, considerando un volume di **1.5 mL** per strip.

3.2 Preparazione dei campioni

Lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente (18-25°C). Mescolare delicatamente i campioni al fine di garantirne l'omogeneità.

Se è prevista una concentrazione di igE Totali nel siero in esame più alta rispetto a quella del Calibratore 5, il campione deve essere diluito con il **DIL** **Diluente campioni di 5 o 10 volte**, in accordo con le istruzioni per l'uso. Un esempio di diluizione manuale del campione è riportato di seguito:

Campione 1 (diluizione 1:5):

80 µL di DIL + 20 µL di campione di siero

Campione 2 (diluizione 1:10):

50 µL di DIL + 50 µL di Campione 1

Agitare su vortex o mescolare accuratamente.

4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEL KIT

La data di scadenza del kit é stampata sull'etichetta esterna; la data di scadenza di ogni componente é stampata sulla rispettiva etichetta.

Il kit **AllergenP Total IgE** deve essere conservato a 2-8 °C al momento del ricevimento, preferibilmente nella confezione del kit originale, fino alla data di scadenza. Una conservazione a T.A. di 25°C é consentita, ma per non più di 15 giorni.

Il periodo di validità del kit é di 18 mesi.

Se utilizzato in diversi test separati, il contenuto del kit deve essere conservato nel modo seguente:

- strips non utilizzate: in un sacchetto sigillato con cerniera richiudibile a 2-8°C fino alla data di scadenza;
- flaconi con **Coniugato E1, Coniugato E2, Tampone di Dosaggio, Diluente campioni, Soluzione Lavaggio** concentrata, **Reagente Bloccante e Soluzione TMB**: a 2-8°C fino alla data di scadenza;
- **Soluzione Lavaggio** preparata per essere utilizzata: a temperatura ambiente (18-25°C) per non più di 5 giorni o a +2-+8 °C per non più di 4 settimane, in un flacone ben chiuso;
- flaconi aperti con i **Calibratori IgE**: a 2-8°C fino alla data di scadenza.

5. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Un set di pipette di precisione variabili e calibrate, con puntali monouso;

- pipetta variabile di precisione calibrata ad 8 canali, con puntali monouso;
- incubatore per micropiastre (37 °C);
- attrezzatura manuale o automatica per il lavaggio dei pozzetti;
- lettore di micropiastre calibrato a: 450 nm, 405 nm, 620 nm;
- beakers e cilindro graduati di volume adeguato;
- acqua distillata o deionizzata;
- guanti di plastica o lattice;
- vaschette di contenimento per dispensare i reagenti con la pipetta ad 8 canali;
- disinfettante;
- materiale assorbente (per il lavaggio manuale).

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per ottenere risultati riproducibili é necessario osservare le seguenti norme:

- Questo kit è solo per uso diagnostico **in vitro**. L'operatore deve seguire attentamente le istruzioni per l'uso in modo da garantire dati affidabili. Le istruzioni per l'uso sono valide solo per il presente kit.
- Non mescolare o usare insieme reagenti del kit appartenenti a lotti diversi, eccetto che per la **Soluzione TMB**, il **Reagente Bloccante** e la **Soluzione Lavaggio**.
- Non utilizzare il kit o i suoi componenti dopo la data di scadenza indicata in etichetta. Prendere in considerazione il periodo di stabilità indicato per i reagenti ricostituiti.
- Non esporre i reattivi e i campioni a calore intenso o a sorgenti di contaminazione.
- Non utilizzare la Soluzione TMB, il Reagente Bloccante e la Soluzione Lavaggio forniti da altri fornitori.
- Usare vetreria perfettamente pulita ed esente da contaminazioni di ioni metallici o sostanze ossidanti.
- Usare acqua distillata, conservata in recipienti perfettamente puliti.
- Evitare accuratamente contaminazioni sia delle soluzioni che dei campioni: a tal fine è consigliabile usare pipette con puntali monouso per ogni campione e per ogni reattivo.
- Non toccare il fondo dei pozzetti.
- i **Calibratori IgE** devono essere dosati in ciascun test separato. Si raccomanda, inoltre, di misurare ogni volta la concentrazione dell'analita nel Controllo.
- Ricostituire gli eventuali reagenti liofilici secondo le modalità descritte sulle etichette e sulle istruzioni per l'uso. Un eventuale utilizzo di reattivi o di volumi non idonei può provocare l'ottenimento di dati clinici non attendibili.

- Se il kit viene utilizzato in più test separati, è necessario togliere i reagenti dall'analizzatore subito dopo la loro dispensazione nei pozzetti di tutte le micropiastre, poiché il liquido tende ad evaporare dai flaconi aperti. Riporre i reagenti in frigorifero.
- Non è consentita la ricalibrazione utilizzando una curva di calibrazione ottenuta con un kit di un altro lotto.
- La **Soluzione TMB** deve essere incolore. Una lieve colorazione della soluzione è accettabile. Evitare l'esposizione diretta alla luce solare della Soluzione TMB.
- Utilizzare un adeguato metodo per la corretta identificazione dei campioni. La loro errata identificazione potrebbe determinare la perdita di specificità del dispositivo e risultati analitici errati.

Per evitare contaminazioni personali ed ambientali é necessario osservare le seguenti norme di sicurezza:

- Utilizzare dispositivi di protezione individuale (es.: guanti monouso, camice, ecc.) durante la manipolazione di materiale potenzialmente infetto e durante il dosaggio.
- Non pipettare i reagenti con la bocca.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Le soluzioni di TMB e Reagente Bloccante (HCl 1N) vanno manipolate con cautela, così come i reattivi contenenti Kathon (Coniugato E1, Coniugato E2, Calibratori IgE, Diluente Campioni e Tampone di Dosaggio). Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto accidentale lavare abbondantemente con acqua.
- I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione del presente kit sono stati testati per la presenza di HBsAg, anti-HiV e anti-HCV e sono risultati ripetutamente negativi. Comunque, poiché nessun test attualmente disponibile garantisce l'assenza degli agenti virali responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita, dell'Epatite B ed Epatite C, tutti i reagenti e tutti i campioni di siero umano devono essere considerati potenzialmente infettivi. Pertanto, i rifiuti del dosaggio devono essere eliminati secondo opportune regole di sicurezza.
- Evitare la produzione di schizzi e la formazione di aerosol. Qualora ciò si verificasse, ripulire accuratamente con ipoclorito di sodio ad una concentrazione del 3% ed eliminare la soluzione utilizzata come residuo potenzialmente infetto.



Come il kit contiene irritante (**CONJ E1**, **CONJ E2**, **CAL**, **BUF AS** and **DIL**), è necessario osservare le seguenti precauzioni:

- P261 - Evitare di respirare la gli aerosol;
- P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro;
- P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi;
- P302+P352 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone;
- P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico;
- P363 - Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente;
- P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le leggi nazionali.



Come il kit contiene i riproduttiva tossicamente materiali (**SUB**), è necessario osservare le seguenti precauzioni:

- P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi;
- P308 + P313 – in caso di esposizione o di possibile esposizione: consultare un medico;
- P363 - Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente;
- P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le leggi nazionali.

Consigli di prudenza secondo il Regolamento CE 1272/2008.

Ai sensi del D.L. italiano n. 22 del 05.02.97, che fa riferimento alle direttive CEE (91/156/CEE, 91/689/CEE, 94/62/CEE) tutti i rifiuti provenienti da lavorazioni manuali e/o in automatico sono classificati rifiuti speciali pericolosi con codice di classificazione CER 180103; devono quindi essere eliminati affidandoli a ditte autorizzate al ritiro ed allo smaltimento.

7. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue in modo asettico mediante prelievo venoso. Dopo coagulazione, il siero deve essere separato per centrifugazione e trasferito in una provetta individuale.

Non utilizzare plasma, siero emolizzato (rosso) o lipemico (lattiginoso), né campioni di siero contenenti sodio azide come conservante.

Conservare i campioni di siero a 2-8 °C per non più di 2 giorni. Aliquotare e congelare a -20 °C o a temperature inferiori per periodi di conservazione più lunghi (ma non superiori a 3 mesi). Evitare cicli ripetuti di congelamento.

8. PROCEDURA DEL TEST

La procedura manuale è descritta nel paragrafo 8.2

Per il Controllo Qualità interno si suggerisce l'utilizzo del Siero di Controllo a concentrazione nota per monitorare le prestazioni del test.

8.1 Procedura per il test automatico

Si garantisce l'applicabilità su strumentazione RADIM e/o SEAC.

Qualora si utilizzi strumentazione automatica di altri fornitori è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato. Per la modalità di utilizzo dell'analizzatore automatico fare riferimento al relativo manuale.

Nota: se il kit viene utilizzato su strumento, eseguendo diversi dosaggi separati, è necessario estrarre i reattivi dall'analizzatore immediatamente dopo la loro dispensazione nei pozzetti di tutte le micropiastre, in quanto il liquido evapora dai flaconi. Porre i reattivi in frigorifero.

8.2 Procedura per il test manuale (vedere schema del test a pag.39)

- A. Utilizzare il pozzetto **A1** per il bianco.
- B. Dispensare **150 µL** di **Tanpone di Dosaggio** **BUF AS** in tutti i pozzetti, **ad eccezione del bianco**.
- C. Pipettare **25 µL** di **CAL** e di campioni dei pazienti nei rispettivi pozzetti.
- D. Agitare delicatamente la **MP** per 10 secondi, prestando attenzione a non lasciare che il contenuto fuoriesca dai pozzetti.
- E. Incubare per **60 minuti** a **37°C**.
- F. Decantare, quindi lavare ciascun pozzetto **3 volte** con **350 µL di Soluzione Lavaggio** (preparata da **WASH 20X**). Assicurarsi che dopo l'ultimo ciclo di lavaggio i residui di soluzione siano stati completamente aspirati dai pozzetti.
- G. Pipettare **100 µL** di **Coniugato E1** **CONJ E1** in tutti i pozzetti, **ad eccezione del bianco**.
- H. Incubare per **30 minuti** a **37°C**.

- I. Decantare, quindi lavare **3 volte** ciascun pozzetto, come descritto nel punto F.
- J. Pipettare **100 µL** di **Coniugato** **CONJ E2** in tutti i pozzetti, **ad eccezione del bianco**.
- K. Incubare per **30 minuti a 37°C**.
- L. Decantare, quindi lavare **3 volte** ciascun pozzetto, come descritto nel punto F.
- M. Pipettare immediatamente **100 µL** di **Soluzione TMB** **SUBS** in ogni pozzetto
- N. . Incubare al buio per **15 minuti a temperatura ambiente**.
- O. Pipettare **100 µL** di **Reagente Bloccante** **STOP** in tutti i pozzetti ed agitare per **1-2 minuti a temperatura ambiente**.
- P. Leggere le DO a **450 nm**, **405 nm** e **620 nm** (lunghezza d'onda di riferimento).

9. ELABORAZIONE DEI DATI

Tracciare le DO delle due curve di calibrazione rispetto alle relative concentrazioni di IgE Totali (UI/mL).

Per tracciare la curva n° 1 (vedere Figura 2A), utilizzare i risultati di misurazione dei calibratori 0...3 alla lunghezza d'onda di 450 nm; per tracciare la curva n° 2 (vedere Figura 2B), utilizzare i risultati di misurazione dei calibratori 0...5 alla lunghezza d'onda di 405 nm.

L'elaborazione dei dati viene eseguita attraverso un'analisi computerizzata, calcolando la media in DO dei Calibratori rispetto alle relative concentrazioni di IgE Totali ed utilizzando un'interpolazione 4PL.

Determinare la concentrazione di IgE Totali del campione come segue:

- Utilizzare la curva standard n° 1 (si veda la Figura 2A) se le DO del campione (a 450 nm) un minore o uguale al Cal 3;
- Utilizzare la curva standard n° 2 (si veda la Figura 2B) se le DO del campione (a 405 nm) sono superiori a Cal 3.

Nota: Se è utilizzata la lunghezza d'onda di riferimento (620 nm), la DO dei calibratori 0 ... 5 e dei campioni misurati a 620 nm dovrebbe essere sottratta da quelli misurati a 450/405 nm: $DO = DO (450/405 \text{ nm}) - DO (620 \text{ nm})$. Questi risultati vengono utilizzati per tracciare le curve standard n° 1 e n° 2 e per determinare le concentrazioni dei campioni.

TIPICO ESEMPIO DI CURVA STANDARD

Non utilizzare per la valutazione dei dati reali del test!

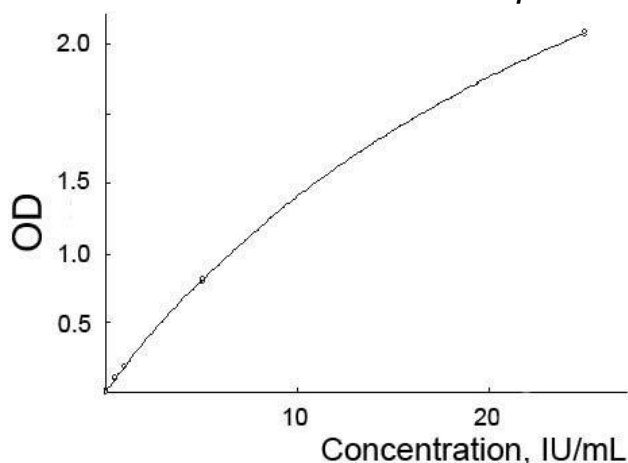


Figura 2A. Tipico esempio di curva standard a 450 nm

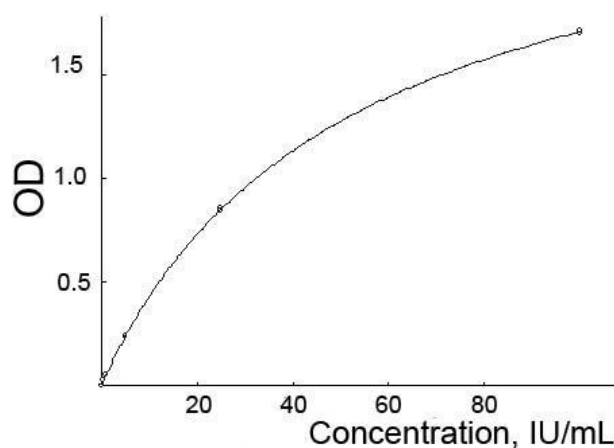


Figura 2B. Tipico esempio di curva standard a 405 nm

Affidabilità dei dati

I dati devono soddisfare i seguenti criteri:

- media delle OD del bianco (nei pozzetti A1) < 0.09;

Se i dati ottenuti non soddisfano tali criteri, i risultati non sono affidabili ed il test deve essere ripetuto.

10. VALORI ATTESI

La diffusione dei valori di IgE è estremamente ampia, sia per i soggetti con che senza malattia allergica, a seconda anche del tipo di popolazione, per esempio: area geografica, sesso ed età. Pertanto, c'è una forte sovrapposizione di livelli di IgE totali tra popolazioni atopiche e non atopiche ed è molto difficile definire un "limite superiore alla norma". È consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli di riferimento per la popolazione di interesse. La letteratura disponibile fornisce le seguenti informazioni, relative alle concentrazioni di IgE totali nel siero umano.

Media: 29.4 IU/mL.

Età (anni)	IU/mL
0-3	<10
3-4	<25
4-7	<50
7-14	<100
>15	<150

11. CONTROLLO DI QUALITÀ

Si consiglia di utilizzare sieri di controllo per garantire la validità dei risultati del dosaggio.

12. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE DEL TEST

12.1 Calibrazione - Tracciabilità

Il kit **AllergenP Total IgE** è stato calibrato verso la WHO Internazionale Campione Standard di Immunoglobulina E (IgE) di umana siero, NIBSC Riferimento 11/234.

12.2 Sensibilità Analitica (limite inferiore di rilevamento)

La sensibilità analitica dell'**AllergenP Total IgE**, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta nel campione del paziente, è pari a 3.9 UI/mL. Tale concentrazione viene definita come la media di 20 replicati del Calibratore 0 più 2 deviazioni standard.

12.3 Test di diluizione

I test di diluizione hanno fornito un valore di CV % nel range 4-20 %.

12.4 Specificità

Nessuna cross-reattività è stata rilevata tra gli anticorpi monoclonali anti-IgE con IgA, IgG, IgM e IgD

12.5 Variazione intra- e inter-saggio:

Per determinare il **CV intra-saggio** sono stati analizzati 8 campioni di siero, ciascuno in 9 replicati. I risultati sono riportati di seguito:

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL	CV Intra-saggio	
		DS	CV %
1	16.5	1.01	7.5
2	35.6	1.53	5.3
3	94.0	4.5	4.4
4	108	5.48	6.2
5	247	4.8	4.2
6	350	6.1	3.5
7	480	20.1	6.8
8	738	23.2	5.2

Per determinare il **CV inter-saggio** sono stati analizzati 8 campioni di siero per 3 volte, da differenti operatori, con 1 settimana di intervallo. Ogni campione è stato testato in 9 replicati. I risultati sono riportati di seguito.

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL			CV Intra-saggio	
	Test 1	Test 2	Test 3	DS	CV, %
1	16.5	15.9	16.8	0.46	2.8%
2	35.6	35.6	36	0.23	0.6%
3	94	95.9	97	1.52	1.6%
4	108	112	107	2.65	2.4%
5	247	239	260	10.60	4.3%
6	350	360	341	9.50	2.7%
7	480	430	490	32.15	6.9%
8	738	706	750	22.74	3.1%

13. LIMITAZIONE DEL METODO

Qualsiasi diagnosi clinica non dovrebbe essere basata solamente sui risultati di metodi diagnostici **in vitro**. Per stabilire una diagnosi il medico dovrebbe prendere in considerazione tutti i risultati clinici e di laboratorio disponibili.

A causa della natura eterogenea degli autoanticorpi umani, alcuni campioni potrebbero non mantenere un parallelismo di diluizione.

14. LEGENDA SIMBOLI: vedere pagina 38.

ENZYME IMMUNOASSAY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL IMMUNOGLOBULIN E (IgE) IN HUMAN SERUM.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY FOR PROFESSIONAL USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATIONS

Normally IgE concentration in serum is very low. It increases gradually from birth to teen-age. In adults normal concentration of IgE may reach 100 IU/mL. In elderly people IgE level sometimes decreases.

IgE production is essential in anti-helminthic immunity. 15-20-fold increase in IgE concentration is observed in the case of ascariasis. But in industrialized countries detection of high IgE concentrations is mainly connected with allergic diseases. Quantitative determination of total IgE has a great prognostic value. In 75% of children born from parents with allergic diseases, serum IgE concentration is >95% from superior limit of normal range for corresponding age group. Detection of high IgE concentrations in serum by enzyme immunoassay is an important tool for differentiation between allergic diseases and other pathologies with similar clinical manifestations (such as asthma, frequent respiratory diseases, chronic rhinitis and dermatitis).

Increased concentration of total IgE in serum was also reported in patients with lymphosarcoma and Hyper-IgE syndrome.

2. PRINCIPLE OF TEST

The **AllergenP Total IgE** method is based on the immunoenzymatic capture system and uses the same solid phase - wells of microstrips sensitized with human anti-IgE antibodies - for all the analyses with the various allergens and for the calibration curves. The calibrators are pipetted into the wells of the first strips and the samples are pipetted into the remaining wells. During the first incubation the anti-IgEs in solid phase (Fig. 1 - MAT1) capture the IgEs of the sample.

After an initial wash to eliminate any possible interference from other immunoglobulins (eg. allergenspecific IgGs), the anti-IgE-Biotin conjugate is added. During this second incubation the anti-IgE-Biotin conjugate binds to the IgE of the calibrators, captured onto the well, to form the solid-phase || -anti-IgE : IgE : anti-IgE-Biotin sandwich (Fig. 1 - MAT2).

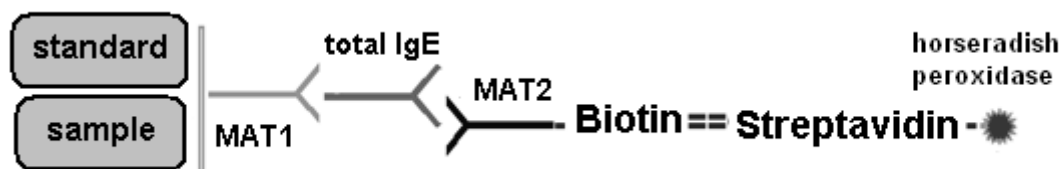


Figure 1. Reaction scheme

After the wash the Streptavidin-Peroxidase conjugate is added to all the wells. This reacts with the anti-IgE-Biotin conjugate, bound onto the wells of the calibrators and the samples.

The last wash eliminates the non-reacted species; finally, the addition of the TMB allows detection of the Streptavidin-Peroxidase conjugate bound to the final solid-phase immunocomplex. The intensity of the colour that develops is directly proportional to the concentration of IgE in samples or calibrators. The IgE concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay. The results are obtained by interpolation against the calibration curve and are expressed in terms of units.

3. CONTENT OF THE KIT

MP	Microplate: 1 microplate with 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-IgE monoclonal antibodies.
0-5 CAL	IgE Calibrators: 6 vials with 0.5 mL each of protein-based solution containing known IgE concentrations: 0 - 10 - 50 - 250 - 500 - 1000 IU/mL . Preservative: Kathon 0.015%. For exact IgE concentrations see vial labels. Ready to use.
CONJ E1	Conjugate E1: 1 vial with 13 mL of solution containing anti-IgE monoclonal antibodies conjugated with Biotin. Preservative: Kathon 0.015%. Ready to use.
CONJ E2	Conjugate E2: 1 vial with 13 mL of solution contains streptavidin conjugated with HRP. Preservative: Kathon 0.015%. Ready to use.
BUF AS	Assay Buffer: 1 vial with 18 mL of saline solution. Preservative: Kathon 0.015%. Ready to use.
DIL	Sample Diluent: 1 vial with 10 mL of protein-based solution. Preservative: Kathon 0.015%. Ready to use.
WASH 20X	Washing Solution.: 1 vial with 50 mL of surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution. 20X Concentrated.
SUBS	TMB Solution: 1 vial with 13 mL of 3,3', 5,5' - tetramethylbenzidine, solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide. Ready to use.
STOP	Blocking Reagent: 1 vial with 13 mL of HCl 1N solution. Ready to use.

3.1 Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

MP Keep **Microplate** at room temperature (18-25°C) for at least 30 minutes before opening the bag. Open the bag and place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL **Calibrators** are ready for use.

CONJ E1 Conjugate E1 is ready to use. Transfer Conjugate into the tray at **1.15 mL** per strip.

CONJ E2 Conjugate E2 is ready to use. Transfer Conjugate into the tray at **1.15 mL** per strip.

WASH 20X Prepare required volume of **Washing Solution** by dilution the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL of **WASH 20X** + 95 mL of distilled water.

Mix thoroughly, avoiding foaming. Keep the prepared wash buffer firmly closed.

SUBS Protect **TMB Solution** from direct light. **TMB Solution** is ready for use. Transfer TMB Solution into the tray at 1.15 mL per strip directly before dispensing.

STOP **Blocking Reagent** is ready to use. Transfer Blocking Reagent into the tray at **1.15 mL** per strip before dispensing.

BUF AS **Assay Buffer** is ready to use. Transfer Assay Buffer into the tray at **1.5 mL** per strip.

3.2 Sample Preparation

Allow samples to reach room temperature (18-25°C). Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

If the expected Total IgE concentration in the samples is higher than in Calibrator 5, the samples should be diluted **5-fold** or **10-fold** with **DIL** **Sample Diluent** in concordance with instructions for use. An example of manual sample dilution is as follows:

Sample 1 (5-fold dilution):

80 µL of **DIL** + 20 µL of serum sample

Sample 2 (10-fold dilution):

50 µL of **DIL** + 50 µL of the **Sample 1**.

Vortex or mix thoroughly.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; expiration date for each component is printed on the respective label.

AllergenP Total IgE kit should be stored at 2-8°C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at 25°C is allowed but for no more than 15 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

If used in several separate experiments, kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at 2-8°C until the expiration date;
- vials with Conjugate E1, Conjugate E2, Assay Buffer, Sample Diluent, concentrated Washing Solution, Blocking Reagent and TMB Solution: at 2-8°C until the expiration date;
- Washing Solution prepared for use: at room temperature (18-25°C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more 4 weeks, in a firmly closed bottle;
- vials with IgE Calibrators and Control: at 2-8°C until the expiration date.

5. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- a set of calibrated variable precision pipettes with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette with disposable tips;
- microplate incubator (37°C);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm, 405 nm, 620 nm);
- graduated beakers and cylinder of appropriate volume;
- distilled or deionized water;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

6. WARNINGS AND PRECAUTIONS

In order to obtain reproducible results, the following rules must be observed:

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except TMB Solution, Blocking Reagent and Washing Solution.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not store or leave reagents and samples at high temperatures or areas of possible contamination.
- Do not use TMB Solution, Blocking Reagent and Wash Solution supplied by other vendors.
- Use thoroughly clean glassware, free from contamination of metal ions or oxidating substances.
- Use distilled water, stored in clean containers.
- Avoid any contamination among samples and solutions; for this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.
- Do not touch the bottom of the wells.
- IgE Calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time analyte concentration in the Control.
- Reconstitute lyophilized reagents, if present, as described on the relative labels and Instructions for use. Any deviation in reagent use or wrong volumes, may affect the reliability of results obtained.
- If kit is used in several separate runs, it is necessary to take reagents from analyser immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator.
- Recalibration using calibration curve, obtained with kit of any other lot, is not allowed.
- TMB Solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
- Utilize a suitable method for the correct identification of patient samples. Incorrect identification may cause a specificity losses of the system and wrong clinical results.

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:

- Use protective individual devices (ex.: disposable gloves, lab coats, etc.) while handling potentially infectious material as well as during the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- TMB Solution and Blocking Reagent (HCL 1N) should be handled with care, as well as the reagents containing Kathon (Conjugate E1, Conjugate E2, IgE Calibrators, Sample Diluent and Assay Buffer). Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious. Therefore, the assay waste must be disposed of in accordance with established safety procedures.
- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.



As the kit contains irritant (**CONJ E1**, **CONJ E2**, **CAL**, **BUF AS** and **DIL**), the following precautions should be observed:

- o P261 - Avoid breathing spray;
- o P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- o P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- o P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- o P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- o P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- o P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.



As the kit contains reproductive toxically materials (**SUB**), the following precautions should be observed:

- o P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- o P308 + P313 – If exposed or concerned: Get medical advice/attention;
- o P363 - Wash contaminated clothing before reuse;

- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

7. According to Italian decree D.L. no. 22 dated 05.02.97, in compliance with EEC directives (91/156/EEC, 91/689/EEC, 94/62/EEC), all waste products originating from either manual and/or automated processing are classified as hazardous special waste material (European classification code 180103). As such, they must be eliminated by delegating to special enterprises, qualified for waste collection and disposal.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood aseptically by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation and transferred to an individual test tube.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at 2-8°C for no more than 2 days; freeze at -20°C or below for longer storage (but no more than 3 months). Avoid repeated freezing.

8. TEST PROCEDURE

The manual procedure must be performed as described in paragraph 8.2.

For internal quality control, it is advisable to use Control Serum at known concentration that allow assay performances to be monitored.

8.1 Assay Procedure for Automatic Test

We guarantee its applications on RADIM and/or SEAC automatic instruments.

While using a non RADIM or SEAC automatic instrument for microplate, it is under end user's responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

While using for the procedure automatic analyser, refer to its relative manual.

Note: If the kit is used on instrument in several separate experiments, it is necessary to take reagents out of analyser immediately after pipetting them into the wells of all plates, because liquid evaporates from vials. Put the reagents into refrigerator.

8.2 Assay Procedure for Manual Test (see assay scheme, page 39)

A. Use **A1** well as "blank well".

B. Pipette **150 µL** of **BUF AS** into all the wells, **except "blank well"**.

C. Pipette **25 µL** of **CAL** and patient's samples into the respective wells.

D. Shake gently the microplate for 10 seconds being careful not to let the content come out from the wells.

- E.** Incubate for **60 minutes** at **37°C**.
- F.** Decant, then wash each well **3 times** with **350 µL** of **Washing Solution** (prepared from **WASH 20X**). Make sure that after the last washing cycle the residual buffer is thoroughly aspirated from the wells.
- G.** Pipette **100 µL** of **CONJ E1** into each well, **except "blank well"**.
- H.** Incubate for **30 minutes** at **37°C**.
- I.** Decant, then wash each well **3 times** as described in paragraph F.
- J.** Pipette **100 µL** of **CONJ E2** into each well, **except "blank well"**.
- K.** Incubate for **30 minutes** at **37°C**.
- L.** Decant, then wash each well **3 times** as described in paragraph F.
- M.** Pipette immediately **100 µL** of **SUBS** into each well. Incubate for **15 minutes in the dark at room temperature**.
- N.** Pipette **100 µL** of **STOP** to all the wells and shake well for **1- 2 minutes at room temperature**.
- O.** Read OD at **450 nm, 405 nm** and **620 nm** (reference wavelength).

9. DATA PROCESSING

Plot two standard curve OD/concentration total IgE in the calibrators (IU/mL). To plot the standard curve n° 1 (see Figure 2A), use the measurements results of calibrators 0...3 at a wavelength of 450 nm; to plot the standard curve n° 2 (see Figure 2B), use the measurements results of calibrators 0...5 at a wavelength of 405 nm.

Data processing is done by a computer-assisted analysis calculating mean OD of calibrators versus their respective total IgE concentrations using 4PL fit.

Determine the total IgE concentration of the sample as follows:

- Use standard curve n° 1 (see Figure 2A) if sample OD (at 450 nm) is less or equal to the Cal 3;
- Use standard curve n° 2 (see Figure 2B) if sample OD (at 405 nm) is more than Cal 3.

Note: If reference wavelength (620 nm) is used, OD of calibrators 0...5 and specimens measured at 620 nm should be subtracted from those measured at 450/405 nm: $OD = OD (450/405 \text{ nm}) - OD (620 \text{ nm})$. These results are used to plot the standard curves n° 1 and n° 2 and to determine specimens concentrations.

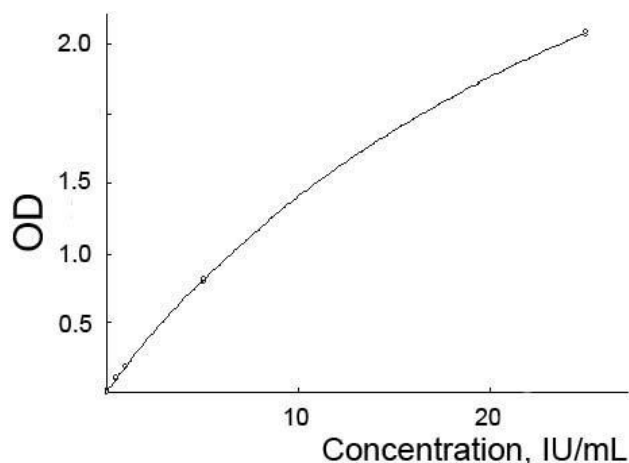
TYPICAL EXAMPLE OF STANDARD CURVE***Do not use for evaluation of real assay data!***

Figure 2A. Typical example of standard curve at 450 nm

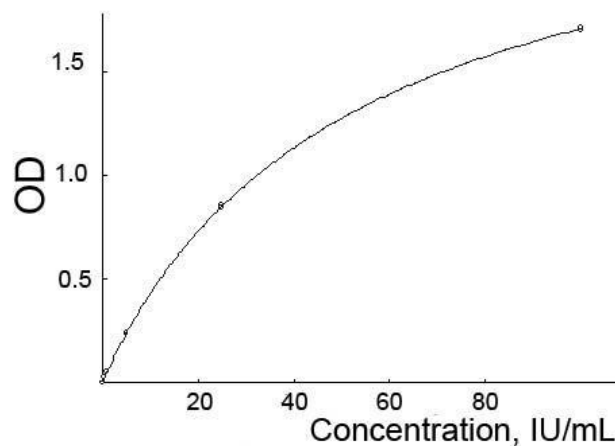


Figure 2B. Typical example of standard curve at 405 nm

Data Reliability

The data should meet the following criteria:

-average blank OD (in well A1) < 0.09;

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

10. EXPECTED VALUES

The spread of IgE values is extremely wide both for subjects with and without allergic disease, depending also on the type of population, i.e. geographical area, sex, and age. Therefore there is a strong overlapping of total IgE levels between atopic and non atopic populations and it is very difficult to define an upper “limit of norma”. It is recommended that each laboratory establishes its own reference range for the population of interest. The available literature provides the following informations relative to total IgE concentrations in human serum.

Mean: 29.4 IU/mL.

Age (years)	IU/mL
0-3	<10
3-4	<25
4-7	<50
7-14	<100
>=15	<150

11. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

12.1 Calibration-Traceability

AllergenP Total IgE kit was calibrated against the WHO International Standard Immunoglobulin E (IgE), human serum NIBSC code: 11/234.

12.2 Analytical Sensitivity (lower detection limit)

Analytical sensitivity **AllergenP Total IgE**, i.e. the lowest detectable concentration that can be distinguished from the patients' sample, is 3.9 IU/mL. It was defined as mean of 20 replicates of Calibrator 0 plus 2 SD.

12.3 Specificity:

No cross-reaction of monoclonal antibodies to IgE was detected with IgA, IgG, IgM and IgD.

12.4 Dilution test

Dilution tests gave values of CV% in the range 4-20 %.

12.5 Intra- and inter-assay variation:

For **intra-assay CV** determination, 8 serum samples were run, each in 9 replicates. The results are showed below.

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	16.5	1.01	7.5
2	35.6	1.53	5.3
3	94.0	4.5	4.4
4	108	5.48	6.2
5	247	4.8	4.2
6	350	6.1	3.5
7	480	20.1	6.8
8	738	23.2	5.2

For **inter-assay CV** determination 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are showed below.

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	16.5	15.9	16.8	0.46	2.8%
2	35.6	35.6	36	0.23	0.6%
3	94	95.9	97	1.52	1.6%
4	108	112	107	2.65	2.4%
5	247	239	260	10.60	4.3%
6	350	360	341	9.50	2.7%
7	480	430	490	32.15	6.9%
8	738	706	750	22.74	3.1%

13. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of **in vitro** diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

Due to the heterogeneous nature of human antibodies there might be samples that do not maintain dilution parallelism.

14. SYMBOLS LEGEND: see page 38.

ENZYMIMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON TOTAL IMMUNGLOBULIN E (IgE) IN HUMANSERUM.

**NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK
NUR FÜR DEN PROFESSIONELLEN GEBRAUCH**

1. KLINISCHE BEDEUTUNG

Normalerweise ist die IgE-Konzentration in Serum sehr niedrig. Sie steigt langsam von der Geburt bis zur Jugend an. Bei Erwachsenen erreichen normale IgE-Konzentrationen 100 IU/ml. Bei älteren Menschen fallen IgE-Werte manchmal ab.

Die IgE-Produktion ist essentiell für die Anti-Helminthische Immunität. Ein 15-20 facher Anstieg der IgE-Konzentration wird bei Ascariasis beobachtet. In den industrialisierten Ländern treten hohe IgE-Konzentrationen hauptsächlich in Verbindung mit allergischen Erkrankungen auf. Die quantitative Bestimmung von Total IgE hat einen großen prognostischen Wert. Bei 75% der Kinder von Eltern mit allergischen Erkrankungen liegt die IgE-Konzentration bei >95% des oberen Normalbereichs im Vergleich zur entsprechenden Altersgruppe. Der Nachweis hoher IgE-Konzentrationen in Serum durch Enzymimmunoassay ist ein wichtiges Mittel für die Differenzierung zwischen allergischen Reaktionen und anderen Erkrankungen mit ähnlichen Manifestationen (wie z.B. Asthma, häufige Atemwegserkrankungen, chronische Rhinitis und Dermatitis).

Von erhöhten Total IgE-Konzentrationen in Serum wurde auch bei Lymphsarkomen und Hyper-IgE-Syndrom berichtet.

2. TESTPRINZIP

Die Methode des **AllergenP Total IgE** basiert auf dem immunenzymatischen μ Capture-System nach dem Sandwich-Prinzip. Die Kalibratoren und Patientenproben werden in die mit monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern beschichteten Wells pipettiert. Während der ersten Inkubation binden die Anti-IgE-Antikörper in den Wells an das IgE der Kalibratoren und Proben (Abb.1 – MAT1).

Nach einem ersten Waschgang wird Anti-IgE-Biotin-Konjugat in die Wells gegeben. Während dieser 2. Inkubation bildet sich nach Zugabe des Anti-IgE-Biotin-Konjugat ein „sandwichartiger“ Komplex aus

Festphase- | | -Anti-IgE : IgE : Anti-IgE-Biotin (Abb.1-MAT2).

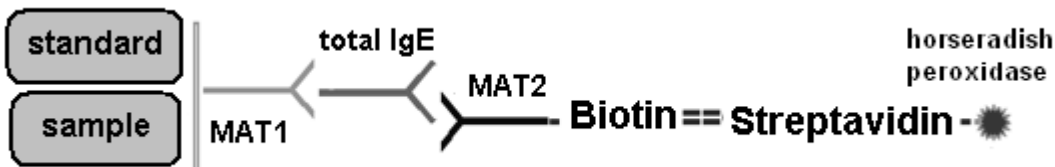


Abb. 1. Reaktionsschema

Nach dem Waschen wird das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in alle Wells pipettiert. Dieses reagiert sowohl mit dem Anti-IgE-Biotin der in den Kalibrator-Wells verblieben ist, als auch mit dem in den Proben-Wells.

Im letzten Waschschrift werden nicht gebundene Antikörper entfernt. Zum Schluss ermöglicht die Zugabe von TMB den Nachweis des Streptavidin-Peroxidase-Konjugates, das an den Festphasen-Immunkomplex gebunden wurde. Die Intensität der entwickelten Farbe korreliert mit der IgE-Konzentration in den Kalibrator- und Proben-Wells. Die IgE-Konzentration in den Proben wird aus der Eichkurve abgelesen, die für jeden Assay erstellt wird. Die Ergebnisse werden durch Interpolation gegen die Eichkurve ermittelt und in Units angegeben.

3. INHALT DES KITS

MP	Microplate: 1 Mikrotiterplatte mit 12 brechbaren 8-Well-Streifen (insgesamt 96 Wells), beschichtet mit monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern.
CAL 0 ... 5	IgE Calibrators: 6 Fläschchen mit jeweils 0,5 ml einer Lösung auf Proteinbasis mit IgE in bekannten Konzentrationen: 0 - 10 - 50 - 250 - 500 - 1000 IU/ml . Konservierungsmittel: 0,015% Kathon. Die exakten IgE-Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Gebrauchsfertig.
CONJ E1	Conjugate E1: ein Fläschchen mit 13 ml. Die Lösung enthält monoklonale Anti-IgE-Antikörper, gekoppelt mit Biotin. Konservierungsmittel: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.
CONJ E2	Conjugate E2: ein Fläschchen mit 13 ml. Die Lösung enthält Streptavidin, gekoppelt mit HRP. Konservierungsmittel: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.
BUF AS	Assay Buffer: 1 Fläschchen mit 18 ml Salzlösung. Konservierungsstoff: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.
DIL	Sample Diluent: 1 Fläschchen mit 10 ml einer Lösung auf Proteinbasis. Konservierungsstoff: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.

WASH 20X	Washing Solution Kit E.W.: 1 Fläschchen mit 50 ml; Tensid in gepufferter Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Waschlösung. 20X konzentriert.
SUBS	TMB Solution AK: 1 Fläschchen mit 13 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Lösung in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid. Gebrauchsfertig.
STOP	Stop Solution: 1 Fläschchen mit 13 ml 1N HCL-Lösung. Gebrauchsfertig.

3.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

MP Die Mikrotiterplatte vor dem Öffnen des Plastikbeutels mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Die benötigte Anzahl Streifen in den Mikrotiterplattenrahmen einsetzen. Nicht benötigte Streifen im gut verschlossenen Plastikbeutel lagern.

CAL | 0 | ... | 5 Calibrators

Die Kalibratoren sind gebrauchsfertig.

CONJ | E1 **Conjugate E1** ist gebrauchsfertig. Pro Streifen 1,15 ml Konjugat in das Tray transferieren.

CONJ | E2 **Conjugate E2** ist gebrauchsfertig. Pro Streifen 1,15 ml in das Tray transferieren.

WASH | 20X Das benötigte Volumen Wash Solution durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser vorbereiten. Beispiel:

5 ml **WASH | 20X** + 95 ml destilliertes Wasser.

Gründlich mischen, Schaumbildung vermeiden. Die vorbereitete Waschlösung fest verschlossen lagern.

SUBS **Substrate** ist gebrauchsfertig. Direkt vor dem Dispensieren pro Streifen 1,15 ml TMB Solution in das Tray transferieren.

Das Substrat vor direktem Licht schützen.

STOP **Blocking Reagent** ist gebrauchsfertig. Vor dem Dispensieren 1,15 ml pro Streifen in das Tray transferieren.

BUF | AS **Assay Buffer** ist gebrauchsfertig. Pro Streifen 1,5 ml Assaypuffer in das Tray transferieren.

3.2 Probenvorbereitung

Bringen Sie die Proben auf Raumtemperatur (18-25°C). Vorsichtig schütteln, um

eine Homogenität herzustellen.

Falls die erwartete Total IgE-Konzentration in den Proben höher als Calibrator 5 ist, sollten die Proben **5fach** oder **10fach** mit **DIL** Sample Diluent entsprechend der Gebrauchsanweisung verdünnt werden. Beispiel für eine manuelle Probenverdünnung:

Probe 1 (5fach-Verdünnung):

80 µl **DIL** Sample diluent + 20 µl Serumprobe

Probe 2 (10fach-Verdünnung):

50 µl **DIL** Sample diluent + 50 µl von Probe 1.

Gründlich vortexen oder mischen.

4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angeben.

Der **AllergenP Total IgE Kit** sollte nach Erhalt bei 2-8°C, bis zum auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum, möglichst in der Originalpackung gelagert werden.

Eine Lagerung bei bis zu 25°C ist für maximal 15 Tage möglich.

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 18 Monate.

Für die Verwendung in mehreren Ansätzen sollte der Kit folgendermaßen gelagert werden:

- nicht benötigte Streifen: fest verschlossen in einem wieder verschließbaren Plastikbeutel bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum;
- ungeöffnete Fläschchen mit Conjugate E1, Conjugate E2, Assay Buffer, Sample Diluent, konzentrierter Wash Solution, Blocking Reagent und Substrat: bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum;
- gebrauchsfertig vorbereitete Wash Solution: bei Raumtemperatur (18-25°C) nicht länger als 5 Tage oder bei +2...+8°C für max. 4 Wochen in einer fest verschlossenen Flasche;
- ungeöffnete Fläschchen mit Calibrator: bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum.

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES ZUBEHÖR UND MATERIALIEN

- Ein Set kalibrierte, variable Präzisionspipetten mit Einwegspitzen;
- Kalibrierte, variable 8-Kanal-Präzisionspipette mit Einwegspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (37°C);
- Zubehör für manuelles oder automatisiertes Spülen der Wells;
- kalibrierter Mikrotiterplatten-Reader (450 nm, 405 nm, 620 nm);
- Messbecher oder -zylinder für die entsprechenden Volumina;
- destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Einmalhandschuhe aus Latex oder Plastik;
- Trays für das Pipettieren von Reagenzien mit einer 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- saugfähiges Material (für manuelles Waschen).

6. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Für fehlerfreie und reproduzierbare Ergebnisse müssen folgende Regeln eingehalten werden:

- Dieser Kit dient nur zur In-vitro-Diagnostik. Um zuverlässige Ergebnisse sicherzustellen, sollte der Benutzer die Gebrauchsinformationen genau beachten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Kit gültig.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen, außer Substrat, Stopplösung und Waschlösung.
- Verwenden Sie keine Reagenzien über das Verfallsdatum hinaus. Beachten Sie die Angaben zur Stabilität rekonstituierter Reagenzien.
- Lagern oder belassen Sie die Reagenzien und Proben nicht bei hohen Temperaturen oder in Bereichen mit möglicher Kontamination.
- Verwenden Sie keine TMB-Lösung, Stopp- oder Waschlösung von anderen Herstellern.
- Verwenden Sie gründlich gesäuberte Glasbehälter, frei von Metallionenkontamination oder oxidierenden Substanzen.
- Verwenden Sie destilliertes oder deionisiertes Wasser, das in absolut sauberen Behältern gelagert wurde.
- Vermeiden Sie sorgfältig eine Kontamination der Proben und Lösungen untereinander; aus diesem Grunde sollten Einwegspitzen für jede Probe und jedes Reagenz verwendet werden.
- Berühren Sie nicht den Boden der Wells.
- Für jeden einzelnen Testansatz müssen Kalibratoren gemessen werden. Es wird auch empfohlen, jedes Mal Kontrollen zu messen.

- Rekonstituieren Sie lyophilisierte Reagenzien, falls vorhanden, wie auf den Etiketten und in den Gebrauchsanweisungen angegeben. Jede Abweichung im Reagenziengebrauch oder falsche Volumina können die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinflussen.
- Falls der Kit in mehreren Testansätzen verwendet wird, ist es nötig, die Reagenzien sofort nach dem Pipettieren in die Wells aus dem Gerät zu nehmen, weil Flüssigkeit aus den Fläschchen verdunstet. Stellen Sie die Reagenzien in einen Kühlschrank.
- Zur Rekalibration dürfen erhaltene Standardwerte einer anderen Kit-Lot nicht verwendet werden.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein, eine leichte Färbung ist akzeptabel. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung auf das Substrat.
- Verwenden Sie eine geeignete Methode für die korrekte Identifizierung von Patientenproben. Eine falsche Probenidentifizierung kann zu einer niedrigeren Spezifität des Systems und falschen klinischen Ergebnissen führen.

Um eine eigene Kontamination und der Umgebung zu vermeiden, müssen folgende Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden:

- Verwenden Sie Schutzkleidung (z.B. Einweghandschuhe, Laborkittel etc.) beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und während der Testdurchführung.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund.
- Während der Testdurchführung nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika anwenden.
- TMB-Lösung und Blocking Reagent (HCL 1N) sollten mit Vorsicht behandelt werden, genau wie Reagenzien mit Kathon (Conjugate E1, Conjugate E2, IgE Calibrators, Sample Diluent, Assay Buffer). Vermeiden Sie Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhaut. Bei versehentlichem Kontakt gründlich unter fließendem Wasser abspülen.
- Alle Materialien humanen Ursprungs, die für die Herstellung dieses Kits verwendet wurden, wurden negativ auf HBsAg, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da zurzeit kein Test die völlige Freiheit von diesen Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien, die biologisches Material enthalten, als potentiell infektiös betrachtet werden. Deshalb muss der Assay-Abfall in Übereinstimmung mit den vorgegebenen Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.
- Vermeiden Sie Spritzer und die Bildung von Aerosolen; reinigen Sie in solchen Fällen sorgfältig mit 3%iger Hydrochloridlösung. Das verwendete Reinigungsmaterial muss als potentiell infektiös betrachtet und entsprechend entsorgt werden.



Der Kit enthält Reizmittel (**CONJ E1** **CONJ E2** **CAL** **ASSAYB** **DIL**), deshalb sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- P261 – Einatmen von Aerosol vermeiden;
- P272 – Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 – Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 – Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 – Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 – Inhalt/Behälter können in Übereinstimmung mit nationalen Vorschriften entsorgt werden.



Der Kit enthält Reproduktions toxisch Materialien (**SUB**), deshalb sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- P280 - Schutzhandschue/Schutzkleidung/Augenschutz tragen;
- P308 + P313 – Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 – Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 – Inhalt/Behälter können in Übereinstimmung mit nationalen Vorschriften entsorgt werden.

Sicherheitshinweis nach EG verordnung Nr. 1272/2008.

Entsprechend der italienischen Verordnung D.L.no22 vom 05.02.97, gemäß der EEC-Direktiven (91/156/EEC, 91/689/EEC, 94/62/EEC), werden alle Abfallprodukte aus manueller und/oder automatisierter Testbearbeitung als gefährlicher Sonderabfall klassifiziert (Europäische Klassifizierung Code 180103). Als solcher müssen sie durch Abgabe an ein Spezialunternehmen, das für die Abfallsammlung und –entsorgung qualifiziert ist, abgegeben werden.

7. PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Entnehmen Sie das Blut aseptisch durch Venenpunktur. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt und jeweils in ein einzelnes Teströhrchen transferiert.

Verwenden Sie kein Plasma, hämolysiertes (hellrot) oder lipämisches (milchig) Serum, oder Serumproben mit Natriumazid als Konservierungsmittel.

Die Proben können bei 2-8°C zwei Tage gelagert werden; darüber hinaus bei -20°C (oder niedriger) einfrieren, aber nicht länger als 3 Monate. Nicht wiederholt einfrieren.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die manuelle Testdurchführung ist in Abschnitt 8.2 beschrieben.

Für die interne Qualitätskontrolle ist es ratsam, Kontrollserum mit bekannter Konzentration zur Überwachung der Testdurchführung einzusetzen.

8.1 Automatisierte Testdurchführung

Wir garantieren die Durchführung auf RADIM- und/oder SEAC-Automaten.

Bei der Verwendung von RADIM- oder SEAC-Automaten für Mikrotiterplatten liegt es in der Verantwortung des Endbenutzers, dass die Geräte entsprechend für ELISA-Kits getestet wurden.

Wenn Sie einen Analyseautomaten verwenden, beachten Sie die entsprechende Bedienungsanleitung.

***Hinweis:** Falls der Kit auf einem Gerät in mehreren Testansetzen verwendet wird, ist es nötig, die Reagenzien sofort nach dem Pipettieren aus dem Gerät zu nehmen, weil Flüssigkeit aus den Fläschchen verdunsten kann. Stellen Sie die Reagenzien in den Kühlschrank.*

8.2 Manuelle Testdurchführung (siehe auch Assayschema, Seite 39)

- A) **A1** als "Blank-Well" verwenden;
- B) **150 µl** Inkubationspuffer **BUF AS** in alle Wells außer "**Blank-Well**" pipettieren;
- C) **25 µl** Kalibratoren **CAL 0 ... 5**, und Patientenproben in die entsprechenden Wells pipettieren.
- D) Die Mikrotiterplatte vorsichtig 10 Sekunden schütteln, aber so, dass kein Inhalt aus den Wells verschüttet wird.
- E) **60 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
- F) Dekantieren und jedes Well 3-mal mit **350 µl** Waschlösung (hergestellt aus **WASH 20X**) waschen. Stellen Sie sicher, dass nach dem letzten Waschen der restliche Puffer sorgfältig aus den Wells abgesaugt wird.
- G) **100 µl** Konjugat **CONJ E1** in alle Wells außer "**Blank-Well**" pipettieren;
- H) **30 Minuten** bei **37°C** inkubieren;
- I) Dekantieren und jedes Well 3-mal waschen, wie in Abschnitt F beschrieben.
- J) **100 µl** Konjugat **CONJ E2** in alle Wells außer "**Blank-Well**" pipettieren;
- K) **30 Minuten** bei **37°C** inkubieren;
- L) Dekantieren und jedes Well 3-mal waschen, wie in Abschnitt F beschrieben.

- M) Sofort danach **100 µl** TMB-Lösung **SUBS** in jedes Well pipettieren.
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
- N) **100 µl** Blocking Reagent **STOP** in alle Wells pipettieren und die Wells
1 - 2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.
- O) Die ODs bei 450 nm, 405 nm und 620 nm (Referenzwellenlänge) messen.

9. DATENAUSWERTUNG

Erstellen Sie zwei Eichkurven mit OD/Konzentration der Total IgE-Kalibratoren (IU/ml).

Für die Standardkurve #1 (siehe Abb. 2A) verwenden Sie die Messergebnisse für die Kalibratoren 0...3 bei einer Wellenlänge von 450 nm; für die Eichkurve #2 (siehe Abb. 2B), verwenden Sie die Messergebnisse für die Kalibratoren 0...5 bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Die Datenverarbeitung erfolgt über eine computerunterstützte Auswertung der OD-Mittelwerte für die Kalibratoren gegen ihre entsprechenden Total IgE-Konzentrationen unter Anwendung der 4PL-Kurvenberechnung.

Bestimmen Sie die Konzentration von Total IgE in den Proben wie folgt:

- Verwenden Sie die Standardkurve #1 (siehe Abb. 2A), wenn die Proben-OD (bei 450 nm) kleiner oder gleich Cal 3;
- Verwenden Sie die Standardkurve #2 (siehe Abb. 2B), wenn die Proben-OD (bei 405 nm) größer Cal 3.

Hinweis: Wenn die Referenzwellenlänge (620 nm) verwendet wird, sollten die ODs der Kalibratoren 0...5 und Proben, gemessen bei 620 nm, von den ODs, gemessen bei 450/405 nm subtrahiert werden: $OD = OD(450/405\text{ nm}) - OD(620\text{ nm})$. Diese Ergebnisse werden für die Eichkurven #1 und #2 verwendet und für die Ermittlung der Probenkonzentrationen.

TYPISCHE STANDARDKURVE (BEISPIEL)

Nicht anstelle der tatsächlich ermittelten Daten verwenden.

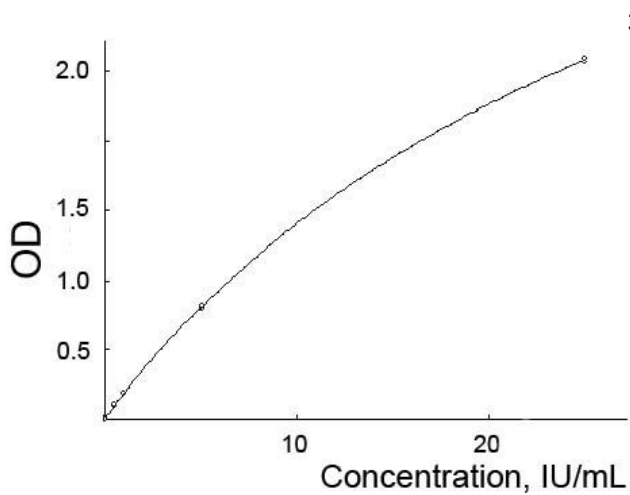


Abb. 2A. Typisches Beispiel einer Standardkurve bei 450 nm

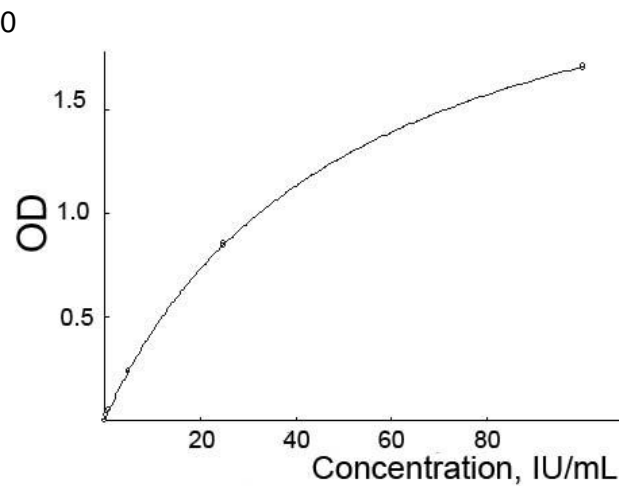


Abb. 2B. Typisches Beispiel einer Standardkurve bei 405 nm

ZUVERLÄSSIGKEIT DES TESTS

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- der mittlere Blank-OD (in Well A1) sollte <0.09 sein.

Falls die ermittelten Daten diese Kriterien nicht erfüllen, werden sie nicht als zuverlässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

10. ZU ERWARTENDE WERTE

Die Verteilung der IgE-Werte ist extrem weit gestreut, sowohl für Menschen mit als auch ohne allergische Erkrankung, in Abhängigkeit auch vom Bevölkerungstyp, geographischer Lage, Geschlecht und Alter. Deshalb gibt es eine starke Überschneidung von IgE-Werten bei atopischen und nicht-atopischen Gruppen und es ist sehr schwierig, eine obere Normalbereichsgrenze festzulegen. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich für die relevante Bevölkerungsgruppe ermittelt. Die verfügbare Literatur gibt folgende Informationen zur Konzentration von Total IgE:

Mittelwert: 29,4 IU/ml

Alter (Jahre)	IU/ml
0-3	<10
3-4	<25
4-7	<50
7-14	<100

≥ 15	< 150
-----------	---------

11. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollseren einzusetzen, um die Validität des Tests sicherzustellen.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

12.1 Kalibrierung-Traceability

AllergenP Total IgE wurde gegen den WHO Internationalen Standard Immunglobulin E (IgE), Humanserum NIBSC Code: 11/234, kalibriert.

12.2 Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität des **AllergenP Total IgE**, d.h. die niedrigste nachweisbare Konzentration, die bei Patientenproben unterschieden werden kann, liegt bei 3,9 IU/ml. Sie ist definiert als der Mittelwert von 20 Replikaten des Calibrator 0 plus 2 SD.

12.3 Verdünnungsstudie

Eine Verdünnungsstudie ergab CV%-Werte in einem Bereich von 4-20%.

12.4 Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktion von monoklonalen IgE-Antikörpern zu IgA, IgG, IgM und IgD nachgewiesen.

12.5. Intra- und Inter-assay

Für die Bestimmung der **Intra-assay CV** wurden 8 Serumproben in 9 Replikaten bestimmt und folgende Ergebnisse ermittelt:

Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml	Intra-assay CV	
		SD	CV%
1	16,5	1,01	7,5
2	35,6	1,53	5,3
3	94,0	4,5	4,4
4	108	5,48	6,2
5	247	4,8	4,2
6	350	6,1	3,5
7	480	20,1	6,8
8	738	23,2	5,2

Für die Bestimmung der Inter-assay CVs wurden 8 Serumproben 3-mal von verschiedenen Mitarbeitern in einwöchigem Intervall bestimmt. Jede Probe wurde in 9 Replikaten gemessen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle.
























Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	16,5	15,9	16,8	0,46	2,8%
2	35,6	35,6	36	0,23	0,6%
3	94	95,9	97	1,52	1,6%
4	108	112	107	2,65	2,4%
5	247	239	260	10,60	4,3%
6	350	360	341	9,50	2,7%
7	480	430	490	32,15	6,9%
8	738	706	750	22,74	3,1%

13. GRENZEN DES VERFAHRENS

Jede klinische Diagnose sollte nicht allein auf Ergebnissen aus der In-vitro-Diagnostik beruhen. Für das Erstellen einer Diagnose sollte ein Arzt alle verfügbaren klinischen und labortechnischen Ergebnisse einbeziehen. Aufgrund der heterogenen Struktur von humanen Antikörpern kann es Proben geben, die in Verdünnungsstudien keine Parallelität zeigen.

14. SYMBOLLEGENDE: siehe letzte Seiten 38.

LEGENDA SIMBOLI /SYMBOL LEGEND

	Codice di riferimento o di ordine / reference or order code/ Referenz- oder Bestellnummer
	Lotto / Lot/ Charge
	Data di scadenza / expiration date/ Verfallsdatum
	Per uso diagnostico in-vitro / For in-vitro diagnostic use/ Nur zur In-vitro-Diagnostik
	Marchatura CE secondo le direttive IVD 98/79/CE / CE marking according to IVD guidelines 98/79/EC/ Markierung entsprechend der IVD Richtlinie 98/79/EG
	Conservare a 2-8°C / keep at 2-8°C/ Lagerung bei 2-8°C
	Fabbricante / Manufacturer/ Hersteller
	Data di Fabbricazione / Date of Manufacture/ Herstellungsdatum
	Rischio biologico / Biohazard/ Biorisiko
	Consultare la metodica operativa / consult instructions for use/ Beachten Sie die Gebrauchsanweisung
	Sufficiente per 96 test / sufficient for 96 tests/ ausreichend für 96 Tests
	Acqua distillata o deionizzata / deionized or distilled water/ destilliertes oder deionisiertes Wasser
	Ricostituire con il volume di liquido specificato / Reconstitute with specified volume of liquid/ Rekonstituieren mit
	Micropiastra / Microplate/ Mikrotiterplatte
	Coniugato E1/ Conjugate E1/ Konjugat E1
	Coniugato E2/ Conjugate E2/ Konjugat E2
	Calibratori / Calibrators/ Kalibratoren
	Soluzione TMB / TMB Solution/ TMB Solution
	Reagente Bloccante / Blocking Reagent/ Stop Solution
	Diluente dei campioni / Sample diluent/ Proben diluent
	Tampone di Dossaggio/Assay Buffer/ Assaypuffer
	Densità ottica / Optical density/ Optische Dichte
	Soluzione Lavaggio, Concentrata 20X/ Washing Solution, 20X Concentrated/ konzentrierte Waschlösung, 20X

SCHEMA DEL DOSAGGIO / ASSAY SCHEME/ ASSAYSHEMA

Pozzetti/ Wells	Bianco/ Blank/ Blank	CAL	Campioni/ Samples/ Proben
Reagenti/ Reagents/ Reagenzien			
BUF AS	–	150 µL	150 µL
CAL	–	25 µL	–
Campioni/ Samples/ Proben	–	–	25 µL
Agitazione e incubazione 1/ Shake and Incubation 1/ Schütteln und Inkubation 1	60 min, +37 °C		
WASH (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 350 µL		
CONJ E1	–	100 µL	100 µL
Incubazione 2/ Incubation 2/ Inkubation 2	30 min, +37 °C		
WASH 20X (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 350 µL		
CONJ E2	–	100 µL	100 µL
Incubazione 3/ Incubation 3/ Inkubation 3	30 min, +37 °C		
WASH 20X (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 350 µL		
SUBS	100 µL	100 µL	100 µL
Incubazione 4/ Incubation 4/ Inkubation 4	15 min, T° ambiente/ Room T°/ Raumtemperatur al buio/in the dark/ im Dunkeln		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Agitazione/Stirring/Mischen	1–2 min, +18...+25 °C		
Misurazione DO/ OD measuring/ OD- Messung	450 nm and 405 nm		
Calcoli/Calculations/ Auswertung	Software corrispondente/ Corresponding software/ entsprechende Software		



Dia Lab Services srl

Legal site via A.De Gasperi 17 – 00041 Albano Laziale (RM) – ITALY

Commercial site via del Mare 131 – 00040 Pomezia (RM) – ITALY

Tel. 0039/(0)6/9111758 – Telefax 0039/(0)6/87462757

