



AllergenA Basic Kit



REF

RA1000



96

REF

RA1003



192

REF

RA1004



480

REF

RA1005



960

REF

RA1100



REAGENTI DEL KIT - KIT REAGENTS - KITREAGENZIE

Reagenti / Reagents/ Reagenz	Quantità / Quantity / Menge				
	96 tests REF RA 1000	192 tests REF RA 1003	480 tests REF RA 1004	960 tests REF RA 1005	
MP	1 x 96	2 x 96	5 x 96	10 x 96	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ E2	18 mL	2 x 18 mL	5 x 18 mL	10 x 18 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
SUBS	1 x 14 mL	2 x 14 mL	5 x 14 mL	10 x 14 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
WASH 20X	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 x 50 mL	Concentrata 20X / 20X Concentrated / 20x konzentriert .
STOP	1 x 19 mL	2 x 19 mL	5 x 19 mL	10 x 19 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig

**AllergeniA Set di Calibrazione / AllergeniA Calibration Set / AllergeniA Kalibrienset
REF RA1100**

Da ordinare separatamente / To be ordered separately / Muss separat bestellt werden.

Reagenti / Reagents / Reagenz	Quantità / Quantity / Menge	
0-6 CAL	7 X 0.7 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
CONTROL	1 X 0.7 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ E1	1 x 8 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig

Allergeni Biotinilati / Biotinylated Allergens / biotinilierte Allergene

Da ordinare separatamente / To be ordered separately / Muss separat bestellt werden.

Reagenti / Reagents / Reagenz	Quantità / Quantity / Menge	
Allergene / Allergen / Allergen /	1 X 3 mL	Liquido o Liofilizzato / Liquid or Lyophilized / flüssig oder lyophilisiert

**AllergeniA IgE Specifiche Sieri di Controllo / AllergeniA Specific IgE Control Sera /
AllergeniA Specific IgE Kontrollseren**

Da ordinare separatamente / To be ordered separately / Muss separat bestellt werden.

Reagenti / Reagents / Reagenz	Quantità / Quantity / Menge	REF
AllergeniA IgE Specifiche Siero di Controllo Positivo-Inalanti / AllergeniA Specific IgE Positive Control Serum-Inhalants / Positivkontrolle-Inhalantien	1 X 1 mL	RA9249
AllergeniA IgE Specifiche Siero di Controllo Positivo-Alimenti / AllergeniA Specific IgE	1 X 1mL	RA9250

Positive Control Serum-Foods / Positivkontrolle-Nahrungsmittel		
AllergenA IgE Specifiche Siero di Controllo Negativo / AllergenA Specific IgE Negative Control Serum / Negativkontrolle	1 x 1 mL	RA9251

DOSAGGIO IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE IMMUNOGLOBULINE IgE SPECIFICHE NEL SIERO UMANO

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

1. APPLICAZIONI CLINICHE

Le IgE partecipano sia alla comparsa che allo sviluppo di reazioni allergiche. Gli allergeni legati a questi anticorpi causano il rilascio di una serie di sostanze vasoattive da parte dei leucociti, che sono alla base dello sviluppo dei sintomi allergici. La definizione e la determinazione quantitativa della concentrazione libera di IgE allergene-specifiche hanno una grande importanza per la diagnostica delle malattie allergiche e per la scelta di una terapia adeguata.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Nell'AllergenA Basic kit, destinato alla rilevazione di anticorpi IgE specifici per particolari allergeni, vengono utilizzati due tipi di dosaggio immunoenzimatico (vedere figura 1). In particolare, il metodo del dosaggio tipo "sandwich" viene impiegato nei micropozzetti per i calibratori. A questo scopo sono utilizzati due anticorpi monoclonali contro IgE con differenti specificità epitopica e coniugati con streptavidina e perossidasi di rafano. Uno degli anticorpi è immobilizzato sulla fase solida (superficie interna dei pozzetti) (Fig.1 - MAT1), un altro è coniugato con estere di biotina (Fig. 1 - MAT2). L'immobilizzazione su fase solida ed il legame delle molecole di IgE contenute nei calibratori si verificano durante la prima incubazione (Fig. 1 - IgE totali) con il coniugato anti-IgE-biotina.

La variante "a cattura" del metodo immunoenzimatico viene impiegata nei pozzetti utilizzati per i campioni di siero. Per la determinazione delle IgE specifiche per un dato allergene (Fig. 1 - allergene specifico) sono utilizzati: un anticorpo monoclonale IgE specifico immobilizzato sulla fase solida (superficie interna dei pozzetti) (Fig. 1 - MAT1), un allergene biotinilato (su indicazione del medico curante) al posto di anticorpi coniugati con estere di biotina ed un coniugato con streptavidina-perossidasi di rafano. L'immobilizzazione delle diverse molecole presenti nel siero avviene sulla fase solida dei pozzetti contenenti i campioni. Se ci sono IgE specifiche per gli allergeni scelti, il legame con l'allergene biotinilato avviene immediatamente. Mediante il successivo lavaggio, l'eccesso di anti-IgE-biotina viene rimosso dai micropozzetti con i calibratori e l'eccesso di allergeni biotinilati viene rimosso dai micropozzetti contenenti campioni di siero. Durante la seconda incubazione il coniugato con streptavidina-perossidasi si lega sia agli anticorpi biotinilati nei micropozzetti con i calibratori, che all'allergene biotinilato nei pozzetti con i campioni testati. La rimozione dell'eccesso di coniugato streptavidina-perossidasi viene eseguita per decantazione e lavaggio dei pozzetti.

Durante l'incubazione con la soluzione TMB si sviluppa una reazione colorimetrica. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla quantità di coniugato streptavidina-perossidasi legato. Sulla base della curva di calibrazione, con valore di densità ottica derivata a 450 nm e 405 nm, viene determinata la concentrazione delle IgE specifiche nel campione del paziente attraverso la misurazione delle densità ottiche della soluzione contenuta nei micropozzetti.

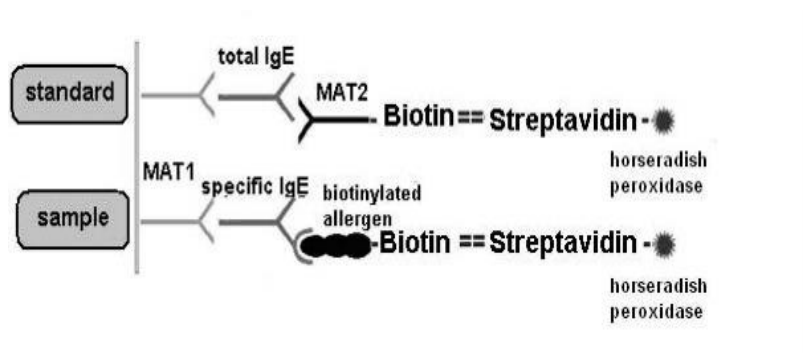


Fig. 1. Schema di reazione

3. CONTENUTO DEL KIT

È stato progettato per 96, 192,480 o 960 determinazioni.

Ogni piatto è sufficiente per un test di 39 campioni in duplicati o 78 campioni in monoplates, se tutte le strip sono utilizzati contemporaneamente. Queste quantità sono definite per la misura dei calibratori, di controllo e di bianco (OD TMB soluzione) in duplicati, ciò che è raccomandato.

È possibile misurare di calibratori, di controllo e di bianco in monoplates, a condizione che l'adeguata precisione è stato dimostrato dall'utente. In questo caso, ogni piatto è sufficiente per un test di 87 campioni.

MP	Micropiastra: micropiastra da 12 strip, ciascuna composta da 8 pozzetti separabili (totale 96 pozzetti) rivestiti con anticorpi monoclonali anti-IgE.
CONJ E2	Coniugato E2: 18 mL per flacone di soluzione contenente streptavidina coniugata con HRP. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
WASH 20X	Soluzione Lavaggio: 50 mL per flacone di tensioattivo in soluzione salina tamponata, sufficiente per preparare 1000 mL di soluzione. Concentrata 20X.
STOP	Reagente Bloccante: 19 mL per flacone di soluzione di HCl 1N. Pronto per l'uso.
SUBS	Soluzione TMB: 14 mL per flacone di soluzione 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina in tampone citrato contenente perossido di idrogeno. Pronto per l'uso.

3.1 AllergenA Set di Calibrazione

0-6 CAL	Calibratori IgE: 0.7 mL per ciascun flacone di soluzione a base proteica contenente concentrazioni note di IgE. Per le esatte concentrazioni di IgE vedere le etichette dei flaconi. Conservante: Kathon 0.015%. Pronti per l'uso.
CONTROL	Siero di Controllo IgE: 0.7 mL per flacone di soluzione a base proteica contenente concentrazioni note di IgE. Per il range esatto di concentrazioni IgE vedere l'etichetta del flacone. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
CONJ E1	Coniugato E1: 8 mL per flacone di soluzione contenente anticorpi monoclonali anti-IgE coniugati con biotina. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.

3.2 Allergeni Biotinilati

Allergene: 3 mL per flacone di preparazione liquida o liofilizzata (conservante: Kathon 0.015%). Le informazioni relative al codice e al nome di ciascun allergene sono descritte nell'etichetta. Un flacone è sufficiente per 26 test.

3.3 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. Inserire il numero necessario di strip nell'apposito alloggiamento. Riporre le strip inutilizzate nella busta richiudibile con minigrip e richiudere correttamente

CAL, **CONTROL** Calibratori IgE e Siero di Controllo IgE

I Calibratori e il Siero di Controllo sono liquidi e pronti per l'uso.

Allergeni Biotinilati: Ricostituire gli Allergeni liofilici con il volume di acqua distillata o deionizzata indicato nelle etichette di ciascun flacone.

Nota: Per il dosaggio manuale, si prega di prendere in considerazione il volume effettivo richiesto nel test per le quantità di Coniugato, Soluzione TMB e Reagente Bloccante, nel momento del loro trasferimento nella vaschetta di contenimento.

CONJ E1 Il **Coniugato E1** è pronto per l'uso. Trasferire il Coniugato nella vaschetta di contenimento considerando un volume di 1.0 mL per strip.

CONJ E2 Il **Coniugato E2** è pronto per l'uso. Trasferire il Coniugato nella vaschetta di contenimento considerando un volume di 1.5 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 La **Soluzione TMB** è pronta per l'uso. Trasferire la Soluzione TMB nella vaschetta di contenimento considerando un volume di 1.15 mL per strip direttamente al momento della dispensazione. Proteggere la Soluzione TMB dalla luce diretta.

STOP Il **Reagente Bloccante** è pronto per l'uso. Trasferire il Reagente Bloccante nella vaschetta di contenimento considerando un volume di 1.58 mL per strip direttamente al momento della dispensazione.

3.4 Preparazione dei campioni

Lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni al fine di garantirne l'omogeneità.

4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEL KIT

La data di scadenza dei kit (AllergenA Basic kit e AllergenA Set di Calibrazione) è stampata sull'etichetta esterna; la data di scadenza di ogni componente è stampata sulla rispettiva etichetta.

I kit devono essere conservati a 2-8 °C dal momento della consegna fino alla data di scadenza, preferibilmente nella confezione del kit originale. La conservazione a 25 °C è consentita, ma per non più di 15 giorni.

Il periodo di validità dei kit è di 18 mesi.

Il periodo di validità degli Allergeni è riportato nelle relative etichette.

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

- strip non utilizzate: in un sacchetto sigillato con cerniera richiudibile a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- flaconi aperti con **Coniugato E1, Coniugato E2 e Soluzione TMB**: a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- flaconi aperti di **Soluzione Lavaggio** concentrata e di **Reagente Bloccante**: a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- **Soluzione Lavaggio** preparata per essere utilizzata: a temperatura ambiente (a 18-25 °C) per non più di 5 giorni, in un flacone ben chiuso;
- flaconi aperti con Calibratori IgE e Siero di Controllo IgE allo stato liquido (pronti per l'uso): a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- Calibratori IgE e Siero di Controllo IgE ricostituiti da preparati liofilizzati: a 2-8 °C per non più di due mesi dopo l'apertura;
- flaconi aperti con Allergeni Biotinilati liquidi: accuratamente chiusi, a 2-8 °C fino alla data di scadenza.

- Allergeni Biotinilati ricostituiti dalle preparazioni liofile: a 2-8 °C per non più di 2 mesi dopo la ricostituzione o a -20 °C fino alla data di scadenza. Sono consentiti fino a un massimo di 4 congelamenti ripetuti.

Il precipitato accettabile sparisce dopo una leggera agitazione.

***Nota:** Se impiegati parzialmente, i kit devono essere utilizzati entro 6 mesi dall'apertura.*

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 a 8 canali con puntali monouso;
- incubatore / agitatore per micropiastre (37 °C, con velocità di agitazione di 400-800 rpm);
- 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;
- vaschetta 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 inquinamento.
- Non utilizzare la **Soluzione TMB**, il **Reagente Bloccante** e la **Soluzione Lavaggio** forniti da altri produttori.
- 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 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. Sotto la luce può avvenire una colorazione della soluzione, pertanto evitare l'esposizione diretta della Soluzione TMB alla luce solare.
- 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 è 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.
- 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. Ad ogni modo, nessun test attualmente disponibile garantisce l'assenza degli agenti virali responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita, dell'Epatite B e dell'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.
- 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, Siero di Controllo IgE ed Allergeni Biotinilati). Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto accidentale lavare abbondantemente con acqua.



Come il kit contiene irritante (CONJ E1 CONJ E2 CAL CONTROL and allergeni), 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.

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, 91/6B9/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 1B0103; devono quindi essere eliminati affidandoli a ditte autorizzate al ritiro e allo smaltimento.

7. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue 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. Congelare a -20°C o a temperatura inferiore per periodi di conservazione prolungata (ma non superiore a 3 mesi). Evitare congelamenti ripetuti.

8. PROCEDURA DEL TEST

La procedura manuale è descritta nel paragrafo 8.2

Per il Controllo Qualità interno, si consiglia 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/NEXT LEVEL. 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. 38)

A. Utilizzare i pozzetti A1 - A2 per il bianco.

B. Pipettare 50 µL di **CAL**, **CONTROL** e 50 µL di campioni nei rispettivi pozzetti.

Nota: Il numero di replicati di ogni campione dipende dal numero di allergeni verso il quale ciascun campione deve essere testato. Un micropozzetto viene utilizzato per la determinazione di ogni singolo allergene.

C. Pipettare 100 µL di **CONJ E1** in ogni pozzetto contenente i Calibratori ed il Siero di Controllo.

D. Pipettare 100 µL di soluzione di Allergeni Biotinilati in ogni pozzetto contenente i campioni.

E. Incubare per 60 minuti a 37 °C in agitazione (500-800 rpm).

Nota: Il tempo totale di dispensazione per i Calibratori ed i campioni non dovrebbe eccedere i 15 minuti, per gli Allergeni 10 minuti, altrimenti i risultati del test potrebbero essere inattendibili a causa delle differenze nei tempi di incubazione.

F. Decantare, quindi lavare ciascun pozzetto 5 volte con 300 µL di **Soluzione Lavaggio** (preparata da **WASH 20X**). Assicurarsi che dopo l'ultimo ciclo di lavaggio i residui di soluzione siano completamente aspirati dai pozzetti.

G. Pipettare 150 µL di **CONJ E2** in ogni pozzetto, tranne il bianco.

H. Incubare per 30 minuti a 37 °C in agitazione (500-800 rpm).

I. Decantare, quindi lavare ciascun pozzetto come descritto nel punto F.

J. Pipettare immediatamente 100 µL di **SUBS** in ogni pozzetto.

Incubare al buio per 15 minuti in agitazione (500-800 rpm) a 37 °C.

K. Pipettare 100 µL di **STOP** in tutti i pozzetti ed agitare per 1 - 2 minuti a temperatura ambiente.

L. Leggere le DO a 450 nm, 405 nm e 620 nm (lunghezza d'onda di riferimento).

9. ELABORAZIONE DEI DATI

Tracciare le DO della curva di calibrazione rispetto alle relative concentrazioni (UI/mL).

Per tracciare la curva #1 (vedere figura 2A), utilizzare i risultati di misurazione dei calibratori 0...3 alla lunghezza d'onda di 450 nm; per tracciare la curva #2 (vedere figura 2B), utilizzare i risultati di misurazione dei calibratori 0...6 alla lunghezza d'onda

di 405 nm. L'elaborazione dei dati viene svolta da un'analisi computer-assistita calcolando la media in DO dei calibratori rispetto alle rispettive concentrazioni di IgE specifiche ed utilizzando un'interpolazione 4PL. Determinare la concentrazione di IgE specifiche del campione come segue:

- Utilizzare la curva standard # 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 # 2 (si veda la Figura 2B) se le DO del campione (a 450 nm) sono superiori a Cal 3.

Nota: Se è utilizzata la lunghezza d'onda di riferimento (620 nm), le DO dei calibratori 0 ... 6 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 # 1 e #2 e per determinare le concentrazioni dei campioni.

TIPICO ESEMPIO DI CURVA STANDARD

Non utilizzare per la valutazione dei dati reali del test

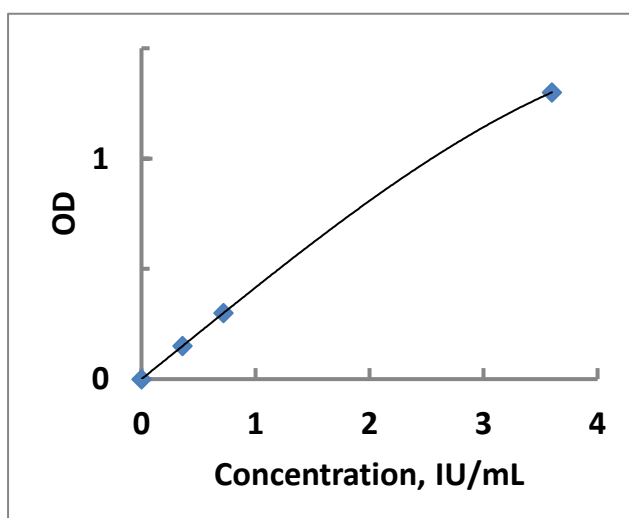


Figura 2A. Tipico esempio di curva standard a 450 nm

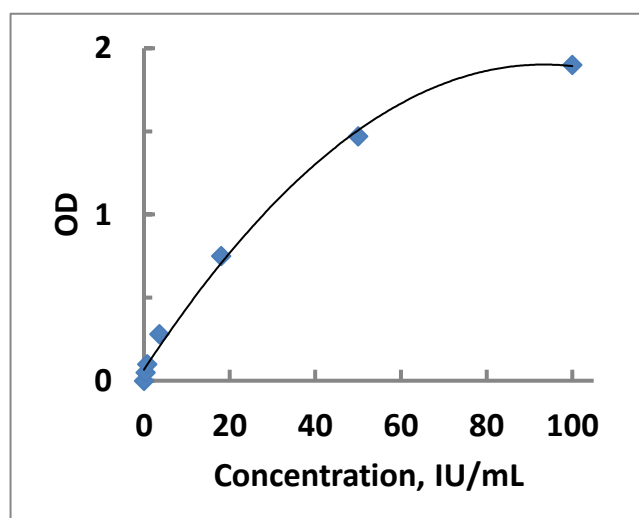


Figura 2B. Tipico esempio di curva standard a 405 nm

9.1 Affidabilità dei dati (per DO misurate a 450 nm)

I dati devono soddisfare i seguenti criteri:

- media delle DO del bianco (nei pozzetti A1-A2) ≤ 0.090 ;
- la concentrazione del Siero di Controllo IgE deve rientrare all'interno del range di accettabilità indicato nell'etichetta del flacone
- la media delle DO dei Calibratori IgE deve essere in accordo con i valori indicati nella tabella sottostante:

Calibratore	Lunghezza d'onda, nm	DO media dei Calibratori dopo sottrazione del bianco
Cal 0	450	< 0.03

Cal 1	450	0.097 - 0.179
Cal 2	450	0.180 - 0.333
Cal 3	450	0.746 - 1.386
Cal 4	450	>2.300
Cal 5	405	>1.000
Cal 6	405	>1.500

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

10. VALORI ATTESI

Concentrazioni di IgE, IU/mL	Classe	Livelli di IgE specifiche
<0.36	0	Clinicamente insignificante
0.36-0.71	1	Molto basso
0.72-3.59	2	Basso
3.60-17.99	3	Medio
18.00-49.99	4	Alto
50.00-100	5	Molto alto
>100	6	Estremamente elevato

11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE DEL TEST

11.1 Calibrazione - Tracciabilità

I Calibratori sono stati calibrati verso la WHO Standard internazionale di Immunoglobuline E (IgE), siero umano NIBSC codice: 11/234.

11.2 Sensibilità Analitica (limite inferiore di rilevamento)

La sensibilità analitica dell'AllergenA Basic kit, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta nel campione del paziente, è pari a 0.15 UI/mL. Tale concentrazione è stata definita come la media di 10 replicati del Calibratore 0 più due deviazioni standard.

11.3 Specificità

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

11.4 Variazione intra- e inter-saggio

Per determinare il CV intra-saggio sono stati analizzati 8 campioni di siero, ciascuno in 12 replicati. I risultati sono riportati di seguito.

Allergeni: albume d'uovo

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL	Intra-saggio	
		SD	CV %
1	0.68	0.008	1.129
2	0.85	0.005	0.57
3	1.67	0.023	1.356

4	3.15	0.027	0.85
5	12.2	0.063	0.515
6	30.5	0.368	1.207
7	65.4	0.468	0.716
8	96.8	2.427	2.508

Per il controllo qualità intra-saggio, sono disponibili i seguenti Sieri di Controllo contenenti concentrazioni note di IgE Specifiche:

REF RA9251 AllergenA IgE Specifiche Siero di Controllo Negativo

REF RA9249 AllergenA IgE Specifiche Siero di Controllo Positivo-Inalanti

REF RA9250 AllergenA IgE Specifiche Siero di Controllo Positivo-Alimenti

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 5 replicati. I risultati sono riportati di seguito.

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL			Inter-saggio	
	Test 1	Test 2	Test 3	SD	CV %
1	0.68	0.64	0.65	0.020	3.1
2	0.85	0.75	0.82	0.048	6.0
3	1.67	1.58	1.59	0.045	2.8
4	3.15	2.97	2.92	0.124	4.1
5	12.2	11.5	11.5	0.368	3.1
6	30.5	30.9	29.5	0.686	2.3
7	65.4	62.7	59.1	3.147	5.0
8	96.8	88.9	83.1	6.876	7.7

12. LIMITAZIONE DEL METODO

Un risultato negativo di AllergenA Basic kit verso gli antibiotici (penicillina G, penicillina V, cefalosporina, ampicillina e amoxicillina) non esclude la presenza di una ipersensibilità clinica a questi allergeni. Questo risultato può essere spiegato con un inizio della reazione allergica che avviene senza la partecipazione di anticorpi IgE o una scelta errata del tempo di campionamento del sangue (prima dell'aumento di concentrazione di IgE specifiche nel sangue o dopo la loro diminuzione di concentrazione). Un risultato negativo del test per le IgE specifiche contro allergeni di origine alimentare e punture di insetti velenosi non esclude la possibilità di insorgenza di allergie a questi allergeni.

Se la concentrazione di IgE totali nel siero del sangue è superiore a 1000 UI/mL le concentrazioni misurate di IgE allergene-specifiche possono essere leggermente inferiori ai valori reali.

Va notato che, per alcuni allergeni, le IgE specifiche possono legarsi ad altri allergeni con struttura analoga (ad esempio: polline della betulla, noci, erba di prato,

pomodoro, ambrosia, melone, ecc). Questo puo accadere per determinanti antigenici comuni in allergeni di varia natura. Tali indicazioni devono essere prese in considerazione quando l'analisi viene utilizzata nelle indagini cliniche.

13. LEGENDA SIMBOLI: vedere pagina 39

ENZYME IMMUNOASSAY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF SPECIFIC IgE IN HUMAN SERUM

**FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY
FOR PROFESSIONAL USE ONLY**

1. CLINICAL APPLICATIONS

IgE takes part in occurrence and progress of allergic reactions. Binding allergens these antibodies obtain an ability to initiate release of a range of vasoactive substances from leucocytes, which define development of allergic symptoms. Definition and quantitative measurement of free allergen-specific IgE concentration have a great importance for diagnostics of allergic diseases and selection of an adequate therapy.

2. PRINCIPLE OF TEST

In the AllergenA Basic kit for detection of IgE antibodies specific to particular allergens two types of enzyme-linked immunosorbent assay are used (see Figure 1). Sandwich-type analysis is employed in microwells intended for standards. For this purpose two monoclonal antibodies against IgE with different epitopic specificity and conjugate of streptavidin with horseradish peroxidase are used. One of the antibodies is immobilized on the solid phase (interior surface of microwells) (Fig. 1 - MAT1); another one is conjugated with biotin ester (Fig. 1 - MAT2). The immobilization on the solid phase and binding of IgE molecules contained in standards happen during the first incubation (Fig. 1 - total IgE) with anti-IgE-biotin conjugate. The "capture"-variant of enzyme immunodetection is employed in wells used for samples of blood serum. One monoclonal antibody specific to IgE and immobilized on the solid phase (interior surface of microwells) (Fig. 1 -MAT1), biotinylated allergen instead of antibodies conjugated with biotin ester (at the choice of attending doctor) and conjugate of streptavidin with horseradish peroxidase are used for determination of IgE to specific allergen (Fig. 1 - specific allergen). Immobilization of different molecules present in blood serum takes place on the solid phase in microwells with samples. If there are IgE specific to chosen allergens, binding of biotinylated allergen occurs at once.

The excess of anti-IgE-biotin is removed from microwells with standards and the excess of biotinylated allergens is removed from microwells with samples of blood serum by means of washing.

During the second incubation the conjugate of streptavidin-peroxidase binds to biotinylated antibodies in microwells with standards and to the biotinylated allergen in microwells with samples tested. Removal of the excess of streptavidin-peroxidase conjugate is performed by decanting and washing of microwells.

During incubation with TMB colour of the solution changes. The colour grade is in proportion to the quantity of the bound streptavidin-peroxidase conjugate. Based on calibration curves with optical density value derived at 450 nm and 405 nm, the concentration of specific IgE in tested samples is defined after the optical density measurement of the solution in microwells.

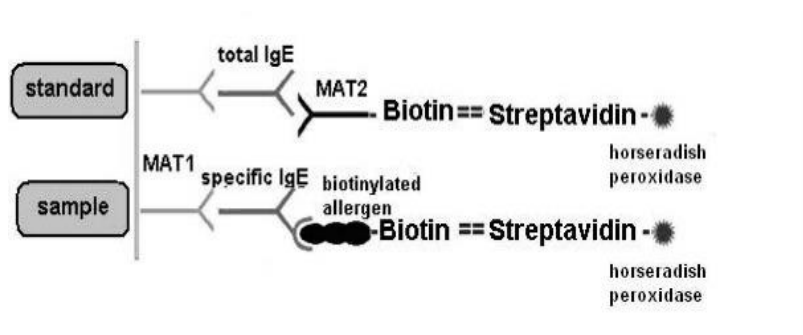


Fig. 1. Reaction scheme

3. CONTENT OF THE KIT

It is designed for 96, 192,480 or 960 determinations.

Each plate is sufficient for an assay of 39 unknowns in duplicates or 78 unknowns in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously. These numbers are based on measuring the calibrators, control and blank (OD of TMB solution) in duplicates, what is recommended.

It is allowed to run the calibrators, control and blank in monoplicates, provided that the sufficient precision was proved by the user. In this case each plate is sufficient for an assay of 87 unknowns.

MP	Microplate: 12 breakable 8-wells strips each (total 96 wells) coated with anti-IgE monoclonal antibodies.
CONJ E2	Conjugate E2: 18 mL per vial of solution contains streptavidin conjugated with HRP. Preservative: Kathon 0.015 %. Ready for 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
STOP	Blocking Reagent: 1 vial with 19 mL of 1 N HCl solution. Ready to use
SUBS	TMB Solution: 1 vial with 14 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide. Ready to use

3.1 AllergenA Calibration Set

0-6 CAL	IgE Calibrators: 0.7 mL per vial of protein-based solution containing known IgE concentrations. For exact IgE concentrations, see vial labels. Preservative: Kathon 0.015 %. Ready to use.
CONTROL	IgE Control Serum: 0.7 mL per vial of protein-based solution containing known IgE concentrations. For exact range of IgE, see vial label. Preservative: Kathon 0.015 %. Ready to use.
CONJ E1	Conjugate E1: 8 mL per vial of solution containing anti-IgE monoclonal antibodies conjugated with Biotin. Preservative: Kathon 0.015 %. Ready for use.

3.2 Biotinylated Allergens

Allergen: 3 mL per vial of liquid or lyophilized solution (preservative: Kathon 0.015 %). Information about code and name of an allergen is reported on the label. One vial is sufficient for 26 assays.

3.3 Reagent Preparation

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

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

CAL, **CONTROL** IgE Calibrators and IgE Control Serum

Liquid Calibrators and Control Serum are ready for use.

Biotinylated Allergens: Reconstitute lyophilized Allergens with the volume of distilled or deionized water indicated on the labels of each vial.

Note: For the manual assay, please take into consideration the actual required volume when filling the amount of Conjugate, TMB Solution and Blocking Reagent into the tray.

CONJ E1 **Conjugate E1** is ready to use. Transfer Conjugate into the tray at 1.0 mL per strip.

CONJ E2 **Conjugate E2** is ready to use. Transfer Conjugate into the tray at 1.5 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 **TMB Solution** is ready to use. Transfer **TMB Solution** into the tray at 1.15 mL per strip directly before dispensing. Protect TMB Solution from direct light.

STOP **Blocking Reagent** is ready to use. Transfer **Blocking Reagent** into the tray at 1.58 mL per strip before dispensing.

3.4 Sample Preparation

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kits (AllergenA Basic kit and AllergenA Calibration Set) is printed on the box label, expiry date for each component is printed on the respective label.

Upon receipt, kits should be stored at +2...+8 °C, preferably in the original kit box until the expiration date. Storage at up to +25 °C is allowed but for no more than 15 days.

Shelf life of the kits is 18 months.

Shelf life of the Allergens is in accordance with the labels.

If used for separate experiments, kits contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until expiration date;
- vials with Conjugate E1, Conjugate E2 and TMB Solution: at +2...+8 °C until expiration date;
- vials with concentrated Washing Solution and Blocking Reagent: at +2...+8 °C until expiration date;
- Washing Solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle;
- liquid (ready to use) Calibrators and IgE Control Serum: at +2...+8 °C until expiration date;
- reconstituted from lyophilized Calibrators and IgE Control Serum: at +2...+8 °C for no more than 2 months after opening;
- vials with liquid Biotinylated Allergens: firmly closed, at +2...+8 °C until expiration date.
- Biotinylated Allergens reconstituted from lyophilized preparations: at +2...+8 °C for no more than 2 months after reconstitution or at -20 °C until expiration date. Repeated freezing is allowable for no more than 4 times.

The precipitate is acceptable which vanishes after light shaking.

Note: *If used partially, kits should be utilized within 6 months after opening.*

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 / shaker (37 °C, shaking speed 400 to 800 rpm);
- 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 Washing 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.

- Utilise 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.
- 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.
- TMB Solution and Blocking Reagent (HCL 1N) should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.



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

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

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

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.

7. 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, haemolysed (bright red) or lipaemic (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 is 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/NEXT LEVEL 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 38)

A. Use A1 - A2 wells as "blank well".

B. Pipette 50 µL of **CAL**, **CONTROL** and 50 µL of patient's samples into the respective wells.

Note: *The number of replicates of each sample depends on the number of allergens to which specific IgE in the sample should be detected. What is more, one microwell is used for determination each allergen-specific IgE.*

C. Pipette 100 µL of **CONJ E1** into each well that contains Calibrators and Control Serum.

D. Pipette 100 µL of solution of Biotinylated Allergens into each well with tested samples.

E. Incubate for 60 minutes at 37 °C while shaking (500-800 rpm).

Note: *Total time of dispensing calibrators and samples should not exceed 15 minutes, of Allergens - 10 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

- F. Decant, then wash each well 5 times with 300 μ L 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 150 μ L of **CONJ E2** into each well, except "blank well".
- H. Incubate for 30 minutes at 37 °C while shaking (500-800 rpm).
- I. Decant, then wash each well as described in paragraph F.
- J. Pipette immediately 100 μ L of **SUBS** into each well.
- Incubate for 15 minutes while shaking (500-800 rpm) in the dark at 37 °C.
- K. Pipette 100 μ L of **STOP** to all the wells and shake well for 1- 2 minutes at room temperature.
- L. Read OD at 450 nm, 405 nm and 620 nm (reference wavelength).

9. DATA PROCESSING

Plot two standard curve OD/concentration specific IgE in the calibrators (IU/mL). To plot the standard curve #1 (see Figure 2A), use the measurements results of calibrators 0...3 at a wavelength of 450 nm; to plot the standard curve #2 (see Figure 2B), use the measurements results of calibrators 0...6 at a wavelength of 405 nm.

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

Determine the specific IgE concentration of the sample as follows:

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

Note: If reference wavelength (620 nm) is used, OD of calibrators 0...6 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 #1 and #2 and to determine specimens concentrations.

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

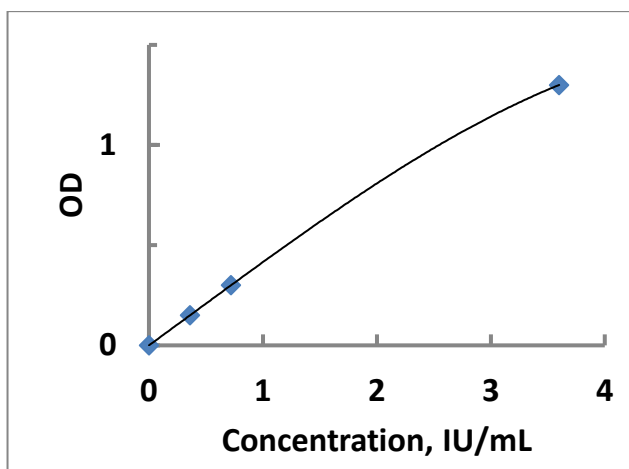


Figure 2A. Typical example of standard curve at 450 nm

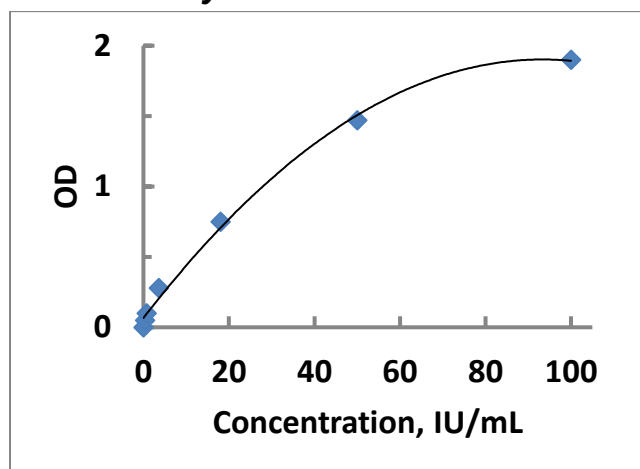


Figure 2B. Typical example of standard curve at 405 nm

9.1 Data Reliability (for OD Measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.090 ;
- concentration of IgE Control Serum must fall within the acceptability range that are shown on the vial label

Calibrator	Wavelength, nm	Average OD of Calibrators after blank subtraction
Cal 0	450	< 0.03
Cal 1	450	0.097 - 0.179
Cal 2	450	0.180 - 0.333
Cal 3	450	0.746 - 1.386
Cal 4	450	> 2.300
Cal 5	405	> 1.000
Cal 6	405	> 1.500

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

10.EXPECTED VALUES

Concentration of IgE, IU/mL	Class	Level of the specific IgE
< 0.36	0	Clinically insignificant
0.36-0.71	1	Very low
0.72-3.59	2	Low
3.60-17.99	3	Medium
18.00-49.99	4	High
50.00-100	5	Very high
> 100	6	Extremely high

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

11.1 Calibration-Traceability

Calibrators were standardized against the WHO International Standard Immunoglobulin E (IgE), human serum NIBSC code: 11/234.

11.2 Analytical Sensitivity (lower detection limit)

Analytical sensitivity of AllergenA Basic kit i.e. the lowest detectable concentration that can be distinguished from the patients' sample is 0.15 IU/mL. It was defined as mean of 10 replicates of Calibrator 0 plus 2 SD.

11.3 Specificity

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

11.4 Intra- and Inter-Assay Variation

For intra-assay CV determination, 8 serum samples were assayed in 12 replicates each. The results are shown below.

Allergens: egg white

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL	Intra-assay	
		SD	CV %
1	0.68	0.008	1.129
2	0.85	0.005	0.57
3	1.67	0.023	1.356
4	3.15	0.027	0.85
5	12.2	0.063	0.515
6	30.5	0.368	1.207
7	65.4	0.468	0.716
8	96.8	2.427	2.508

For intra-assay quality control, the following Control Sera containing specific IgEs at known concentration are available:

REF RA9251 AllergenA Specific IgE Negative Control Serum

REF RA9249 AllergenA Specific IgE Positive Control Serum-Inhalants

REF RA9250 AllergenA Specific IgE Positive Control Serum-Foods

For inter-assay CV determination, 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 5 replicates. The results are shown below.

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL			Inter- assay	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV %
1	0.68	0.64	0.65	0.020	3.1
2	0.85	0.75	0.82	0.048	6.0
3	1.67	1.58	1.59	0.045	2.8
4	3.15	2.97	2.92	0.124	4.1
5	12.2	11.5	11.5	0.368	3.1
6	30.5	30.9	29.5	0.686	2.3
7	65.4	62.7	59.1	3.147	5.0
8	96.8	88.9	83.1	6.876	7.7

12. LIMITATION OF THE METHOD

A negative result of AllergenA Basic kit against antibiotics (penicillin G, penicillin V, cephalosporin, ampicillin and amoxicillin) doesn't exclude presence of a clinical hypersensitivity to these allergens. This result can be explained by initiation of the allergic reaction that takes place without participation of IgE antibodies or a wrong choice of blood sampling time (before the increase of specific IgE concentration in blood or after their concentration decrease).

A negative result of specific IgE assay against food-borne allergens and bites of venomous insects doesn't exclude possibility of occurrence of allergy to these allergens. If concentration of total IgE in blood serum is higher than 1000 IU/mL measured concentrations of allergen-specific IgE may be slightly lower than the real values.

It should be noted that IgE specific to certain allergens can bind other allergens with the same structure (e.g. birch pollen, nuts, meadow grass, tomato, ambrosia and melon etc.). This can happen of common antigenic determinants in allergens of different nature. These facts should be taken into account when the assay is used in clinics.

13. SYMBOLS LEGEND: see page 39

ENZYMIMMUNOASSAY FÜR DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SPEZIFISCHEM IgE IN HUMANSERUM

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

1. ZUSAMMENFASSUNG

IgE ist an der Entstehung und am Fortschreiten von allergischen Reaktionen beteiligt. Durch das Binden von Allergenen erhalten diese Antikörper die Fähigkeit, die Freisetzung von verschiedenen vasoaktiven Substanzen von Leukozyten auszulösen, die zu allergischen Symptomen führen. Diese Erkenntnis und die quantitative Messung von freier allergenspezifischer IgE-Konzentration sind von großer Bedeutung für die Diagnose von allergischen Erkrankungen und die Auswahl einer geeigneten Therapie.

2. TESTPRINZIP

Im AllergenA Basic Kit zum Nachweis von IgE-Antikörpern, die für bestimmte Allergene spezifisch sind, werden zwei Arten von enzymgebundenem Immunsorbentassay verwendet (siehe Abbildung 1). Sandwich-Typ-Analyse wird verwendet in Mikrowells, die für Standards bestimmt sind. Zu diesem Zweck werden zwei monoklonale Antikörper gegen IgE mit unterschiedlicher epitopischer Spezifität und Konjugat von Streptavidin mit Meerrettichperoxidase verwendet. Einer der Antikörper ist auf der festen Phase immobilisiert (Innenfläche von Mikrowells) (Abb. 1 - MAT1); ein anderer wird mit Biotinester konjugiert (Abb. 1 - MAT2). Die Immobilisierung auf der festen Phase und Bindung von IgE-Molekülen, die in Standards enthalten sind, erfolgen während der ersten Inkubation (Abb. 1 - total IgE) mit Anti-IgE-Biotinkonjugat. Die "Capture"-Variante des Enzymimmundetektions wird in Well eingesetzt, die für Proben von Blutserum verwendet werden. Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für IgE ist und auf der festen Phase immobilisiert ist (Innenoberfläche von Mikrowells) (Abb. 1 -MAT1), biotinyliertes Allergen anstelle von Antikörpern, die mit Biotinester konjugiert sind (bei Wahl des behandelnden Arztes) und Konjugat von Streptavidin mit Meerrettichperoxidase werden zur Bestimmung von IgE auf spezifische Allergene verwendet (Abb. 1 - spezifisches Allergen). Die Immobilisierung verschiedener Moleküle im Blutserum erfolgt in der festen Phase in Mikrowells für Patientenproben. Wenn es spezifische IgE für ausgewählte Allergene gibt, erfolgt die Bindung von biotinylierten Allergenen. Der Überschuss an Anti-IgE-Biotin für die Standards wird aus den Mikrowells entfernt und der Überschuss an biotinylierten Allergenen wird durch Waschen aus Mikrowells für Patientenproben.

Während der zweiten Inkubation bindet das Konjugat von Streptavidin-Peroxodase an biotinylierte Antikörper in Mikrowells für die Standards und an das biotinylierte Allergen in Mikrowells für Patientenproben. Überschuss an Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erfolgt durch Dekantieren und Waschen der Mikrowells.

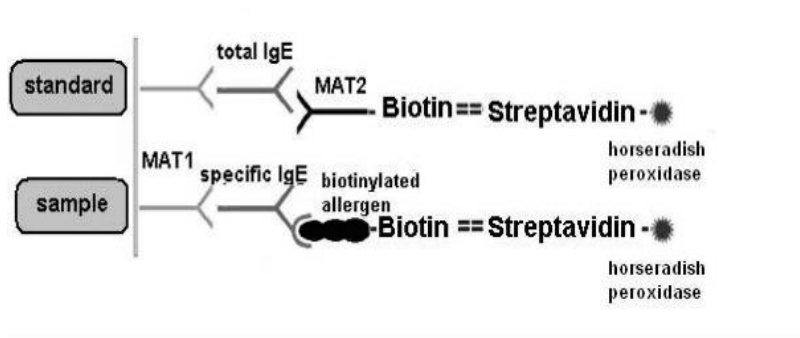


Fig. 1. Reaktions Schema

3. INHALT DES KIT

Das Kit ist für 96, 192.480 oder 960 Bestimmungen ausgelegt.

Jede Platte reicht für einen Test von 39 Proben in Duplikaten oder 78 Proben in Einzelbestimmung aus, sofern alle Streifen gleichzeitig verwendet werden. Diese Zahlen basieren auf der Messung der Kalibratoren, Kontrollen und Blanks (OD der TMB-Lösung) in Duplikaten, was empfohlen wird.

Es ist erlaubt, die Kalibratoren, Kontrollen und Blanks in Einzelbestimmung laufen zu lassen, vorausgesetzt, dass die ausreichende Präzision durch den Benutzer nachgewiesen wurde. In diesem Fall reicht jede Platte für einen Test von 87 Proben aus.

MP	Microplate: 12 brechbare Streifen mit jeweils 8 Wells (insgesamt 96 Wells), beschichtet mit monoklonalen Anti-IgE Antikörpern.
CONJ E2	Conjugate E2: 18 ml pro Fläschchen mit einer Lösung, die mit HRP konjugiertes Streptavidin enthält. Konservierungsmittel: 0,015% Kathon. Gebrauchsfertig.
STOP	BLOCKING REAGENT: 19 ml pro Fläschchen mit 1N HCl-Lösung. Gebrauchsfertig.
SUBS	TMB SOLUTION AK: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 14 ml pro Fläschchen einer Lösung in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid. Gebrauchsfertig.
WASH 20X	WASHING SOLUTION KIT E.W.: 50 ml Tensid in gepufferter Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Waschlösung. 20X konzentriert.

3.1 AllergenA IgE Kalibriereset

0-6 CAL	IgE Calibrators: 0,7 ml pro Fläschchen; eine Lösung auf Proteinbasis mit bekannten IgE-Konzentrationen. Die genauen IgE-Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Konservierungsmittel: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.
CONTROL	IgE Control Serum: 0,7 ml pro Fläschchen; eine Lösung auf Proteinbasis mit bekannten IgE-Konzentrationen. Der genaue IgE-Bereich ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Konservierungsmittel: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.
CONJ E1	Conjugate E1: 8 ml pro Fläschchen; eine Lösung mit monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern, gekoppelt mit Biotin. Konservierungsmittel: 0,015 % Kathon. Gebrauchsfertig.

3.2 Biotinylierte Allergene

Allergen: 3 ml pro Fläschchen; flüssige oder lyophilisierte Lösung. Konservierungsmittel 0,015 % Kathon. Informationen zum Code und Namen des Allergens sind auf dem Fläschchenetikett angegeben. Ein Fläschchen ist ausreichend für 26 Tests.

3.3 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, **CONTROL** **IgE Calibrators und IgE Control Serum**

Flüssige Kalibratoren und Kontrollseren sind gebrauchsfertig.

Biotinylierte Allergene: Lyophilisierte Allergene mit der auf jedem Fläschchenetikett angegebenen Menge destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren.

CONJ E1 Konjugat E1 ist gebrauchsfertig. Pro Streifen in das Tray 1,0 ml Conjugate transferieren.

CONJ E2 Konjugat E2 ist gebrauchsfertig. Pro Streifen in das Tray 1,50 ml Conjugate 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 TMB Solution ist gebrauchsfertig. Direkt vor dem Dispensieren pro Streifen in das Tray 1,15 ml TMB Solution transferieren. TMB Solution AK vor direktem Licht schützen.

STOP Blocking Reagent ist gebrauchsfertig. Vor dem Dispensieren pro Streifen 1,58 ml Blocking Reagent in das Tray transferieren.

Hinweis: Für den manuellen Assay berechnen Sie das tatsächlich benötigte Volumen, bevor Sie Konjugat, TMB Solution und Blocking Reagent in das Tray geben.

3.4 Probenvorbereitung

Bringen Sie die Proben auf Raumtemperatur. Schütteln Sie die Proben vorsichtig, um eine Homogenität sicherzustellen.

4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS

Das Verfallsdatum der Kits (Basic Kit und Calibration Set) sind auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Fläschchenetikett angegeben.

Nach Erhalt sollten die Kits bei 2-8°C bis zu dem 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 der Kits beträgt 18 Monate.

Die Haltbarkeit der Allergene entspricht den Angaben auf den Etiketten.

Für die Verwendung in mehreren Ansätzen sollten die Kits 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 und TMB Solution, 20X konzentrierte Wash Solution und Blocking Reagent: 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 und Control Serum: bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit flüssigen Allergenen: fest verschlossen bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum.

Lyophilisierte Allergene nach Rekonstitution: bei 2-8°C nicht länger als 2 Monate nach Rekonstitution oder bei -20°C bis zum Verfallsdatum. Bis zu 4 wiederholte Einfrierzyklen sind möglich.

Hinweis: Bei teilweisem Materialverbrauch sollten die Kits innerhalb von 6 Monaten nach dem Öffnen verbraucht werden.

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES ZUBEHÖR UND MATERIALIEN

- Ein Set kalibrierter, variabler Präzisionspipetten mit Einwegspitzen;
- kalibrierte, variable 8-Kanal-Präzisionspipette mit Einwegspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator/ Shaker (37°C, Schüttelgeschwindigkeit 400 bis 800 Rpm);
- 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.
- 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 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 aus dem Gerät zu nehmen, weil Flüssigkeit aus den Fläschchen verdunsten kann. Stellen Sie die Reagenzien in einen Kühlschrank.
- 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:

- Tragen 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. Vermeiden Sie Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhaut. Bei versehentlichem Kontakt gründlich unter fließendem Wasser abspülen und ggf. einen Arzt aufsuchen.
- 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** **CONTROL** und Allergene), deshalb sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- P261 – Einatmen von Aerosol vermeiden;
- P272 – Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 – Schutzhandschue/Schutzkleidung/Augenschutz tragen;
- P302+P352 – Bei Berührung 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.

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-, SEAC und Next Level-Automaten. Ebenfalls wurden die Kits auf Adaltis-Instrumenten validiert.

Wenn Sie einen Analyseautomaten verwenden, beachten Sie die entsprechende Bedienungsanleitung. Individuelle Gegebenheiten vor Ort können eine Anpassung einzelner Schritte der Testdurchführung notwendig machen.

***Hinweis:** Falls der Kit auf einem Gerät 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 verdunsten kann. Stellen Sie die Reagenzien in den Kühlschrank.*

8.2 Manuelle Testdurchführung (siehe Assayschema, Seite 38)

A. **A1 – A2** als “Blank-Well”.

B. **50 µl** der Kalibratoren **CAL00...06**, Kontrollserum **CONTROL** (falls eine Kontrolle in den Assay eingesetzt wird) und **50 µl** Patientenproben in die entsprechenden Wells pipettieren.

***Hinweis:** Die Anzahl der Replikate für jede Probe hängt ab von der Anzahl der Allergene, für die spezifisches IgE in der Probe nachgewiesen werden soll. Für die Bestimmung von jedem allergenspezifischen IgE wird ein Well verwendet.*

C. **100 µl** Konjugat **CONJ0E1** in alle Wells pipettieren, die Kalibratoren oder Kontrollen (falls vorhanden) enthalten, außer “Blank”.

D. **100 µl** Allergen in die zu testenden Proben-Wells pipettieren.

E. **60 Minuten** bei **37°C** unter **Schütteln** (500-800 Rpm) inkubieren.

Hinweis: Die Gesamtzeit der Abgabe von Kalibratoren und Proben sollte 15 Minuten nicht überschreiten, bei Allergenen 10 Minuten, sonst kann das Testergebnis unzuverlässig sein, da die Zeit der Inkubation für verschiedenen Proben.

- F. Dekantieren und jedes Well 3-mal mit **300 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. **150 µl** Konjugat **CONJ□E2** in alle Wells pipettieren, außer "Blank".
- H. **30 Minuten** bei **37°C** unter **Schütteln** (500-800 Rpm) inkubieren.
- I. Dekantieren und jedes Well 3-mal waschen, wie in Abschnitt F beschrieben.
- J. Sofort danach **100 µl** TMB-Lösung **SUBS** in jedes Well pipettieren.
15 Minuten im Dunkeln bei **37°C** unter **Schütteln** (500-800 Rpm) inkubieren.
- K. **100 µl** Blocking Reagent **STOP** in alle Wells pipettieren und die Wells 1–2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.
- L. Die ODs bei **450 nm**, **405 nm** und **620 nm** (Referenzwellenlänge) messen.

9. DATENAUSWERTUNG

Erstellen Sie zwei Eichkurven mit OD/Konzentration der spezifischen 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...6 bei einer Wellenlänge von 405 nm.

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

Bestimmen Sie die Konzentration von spezifischem 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 ist;
- Verwenden Sie die Standardkurve #2 (siehe Abb. 2B), wenn die Proben-OD (bei 450 nm) größer Cal 3 ist.

Hinweis: Wenn die Referenzwellenlänge (620 nm) verwendet wird, sollten die ODs der Kalibratoren 0...6 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.

TYPISCHES BEISPIEL FÜR STANDARDKURVE

Nicht für die Auswertung von echten Assay-Daten verwenden!

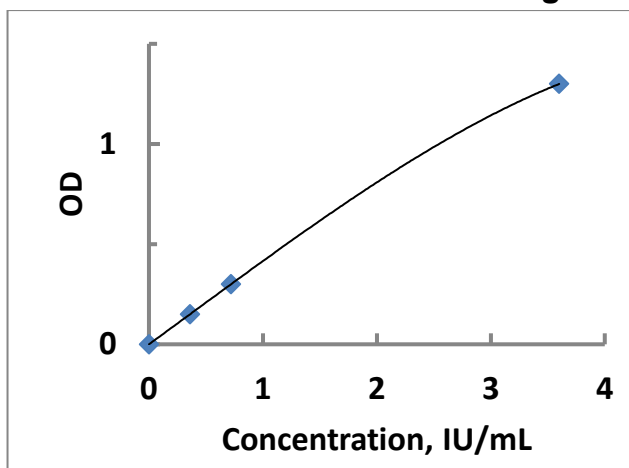


Abbildung 2A. Typisches Beispiel für Standardkurve bei 450 nm

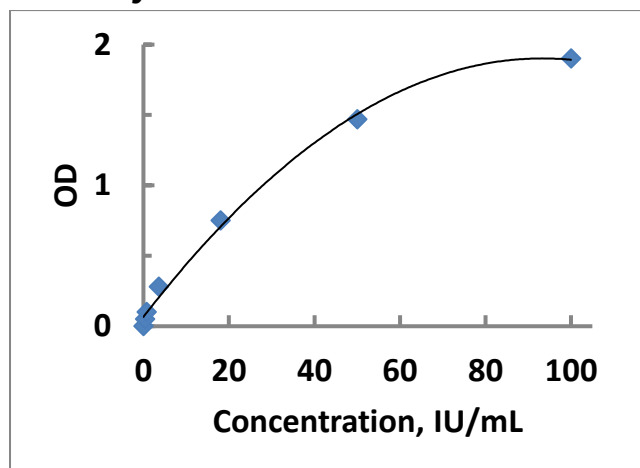


Abbildung 2B. Typisches Beispiel für Standardkurve bei 405 nm

9.1 ZUVERLÄSSIGKEIT DES TESTS (für ODs gemessen bei 450 nm)

Die Messdaten sollten die folgenden Kriterien erfüllen:

- Der OD-Wert des Blanks (in Well A1-A2) muss $\leq 0,090$ sein (nur beim manuellen Assay);
- Konzentration von IgE Control Serum muss innerhalb des Akzeptanzbereichs liegen, der auf dem Fläschchenetikett genannt ist.

Kalibrator	Wellenlänge, nm	Durchschnittliche OD von Kalibratoren nach Leersubtraktion
Cal 0	450	< 0,03
Cal 1	450	0.097 - 0.179
Cal 2	450	0.180 - 0.333
Cal 3	450	0.746 - 1.386
Cal 4	450	> 2.300
Cal 5	405	> 1.000
Cal 6	405	> 1.500

Wenn die erhaltenen Daten die Kriterien nicht erfüllen, gelten die Ergebnisse als unzuverlässig, und der Test sollte wiederholt werden.

10. ZU ERWARTENDE WERTE

IgE-Konzentration, IU/ml	Klasse	Level von spezifischem IgE
<0,36	0	klinisch nicht signifikant
0,36-0,71	1	sehr niedrig
0,72-3,59	2	niedrig
3,60-17,99	3	erhöht

18,00-49,99	4	hoch
50,00-100	5	sehr hoch
>100	6	extrem hoch

11. TESTCHARAKTERISTIKA

11.1 Kalibrierung-Traceability

Die Kalibratoren wurden gegen den WHO Internationalen Standard Immunglobulin E (IgE), Humanserum NIBSC Code: 11/234, standardisiert.

11.2 Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität der **AllergenA Kits**, die der niedrigsten nachweisbaren Konzentrationsdifferenz in den Proben entspricht, liegt bei 0,15 IU/ml. Sie wurde definiert als Mittelwert von 10 Replikaten des Calibrator 0 plus 2 SD.

11.3 Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktion von monoklonalen Antikörpern gegen IgE mit IgA, IgG, IgM und IgD beobachtet.

11.4 Intra- und Inter-Assay Variation

Für die Bestimmung des Intra-assay CV wurden 8 Serumproben jeweils in 12 Replikaten gemessen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle.

Allergen: Eiweiß

Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml	Intra-assay	
		SD	CV %
1	0,68	0,008	1,129
2	0,85	0,005	0,57
3	1,67	0,023	1,356
4	3,15	0,027	0,85
5	12,2	0,063	0,515
6	30,5	0,368	1,207
7	65,4	0,468	0,761
8	96,8	2,427	2,508

Für die Intra-assay Qualitätskontrolle stehen folgende Kontrollseren mit bekannter Konzentration von spezifischem IgE zur Verfügung:

REF RA9251	Negativkontrollserum
REF RA9249	Positivkontrollserum - Inhalantien
REF RA9250	Positivkontrollserum – Nahrungsmittel

Für die Bestimmung der Inter-assay CVs wurden 8 Serumproben 3-mal von verschiedenen Mitarbeitern in einwöchigem Intervall bestimmt. Jede Probe wurde in 5 Replikaten gemessen. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle.

Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml			Interassay	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV %
1	0.68	0.64	0.65	0.020	3.1
2	0.85	0.75	0.82	0.048	6.0
3	1.67	1.58	1.59	0.045	2.8
4	3.15	2.97	2.92	0.124	4.1
5	12.2	11.5	11.5	0.368	3.1
6	30.5	30.9	29.5	0.686	2.3
7	65.4	62.7	59.1	3.147	5.0
8	96.8	88.9	83.1	6.876	7.7

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Ein negatives Ergebnis im **AllergenA Kit** gegen Antibiotika (Penicillin G, Penicillin V, Cephosporin, Ampicillin und Amoxicillin) schließt eine klinische Hypersensitivität gegen diese Allergene nicht aus. Dieses Ergebnis kann so erklärt werden, dass die allergische Reaktion ohne eine Beteiligung von IgE-Antikörpern ausgelöst wird, oder eine falsche Wahl der Blutabnahmezeit (vor dem Anstieg der spezifischen IgE-Konzentration im Blut oder nach dem Abfall) gewählt wurde.

Ein negatives Ergebnis im spezifischen IgE-Assay gegen Nahrungsmittelallergene und Bisse von giftigen Insekten schließt die Möglichkeit einer Allergie gegen diese Allergene nicht aus.

Wenn die Konzentration von Total-IgE im Serum höher als 1000 IU/ml ist, können die gemessenen Konzentrationen von allergenspezifischem IgE etwas niedriger als die tatsächlichen Werte sein.








Spezifisches IgE gegen bestimmte Allergene können andere Allergene mit derselben Struktur binden (z.B. Birkenpollen, Nüsse, Wiesengras, Tomaten, Ambrosia und Melone etc.). Dies kann aufgrund gemeinsamer antigener Determinanten in Allergenen unterschiedlicher Natur auftreten. Diese Fakten sollten beim klinischen Einsatz des Assays beachtet werden.

13. SYMBOLLEGENDE: Seite 39.

14. SCHEMA DEL DOSSAGGIO/ ASSAY SCHEME / ASSAY SCHEMA

Reagenti/ Reagents / Reagenzien	Pozzetti/ Wells/Wells	Bianco/ Blank / Blank	CAL CONTROL	Campioni/ Samples / Proben
CAL CONTROL		–	50 µL	–
Campioni/ Samples / Proben		–	–	50 µL
CONJ E1		–	100 µL	–
Soluzione di Allergeni/ Solution of Allergens / Lösung Allergene		–	–	100 µL
Incubazione/ Incubation / Inkubation №1	60 min, 37 °C, 500–800 rpm			
WASH 20X (diluita/ diluted / verdünnt)	5 x 300 µL			
CONJ E2		–	150 µL	150 µL
Incubazione/Incubation / Inkubation №2	30 min, 37 °C, 500–800 rpm			
WASH 20X (diluita/ diluted / verdünnt)	5 x 300 µL			
SUBS		100 µL	100 µL	100 µL
Incubazione/Incubation / Inkubation №3	15 min, 37 °C, 500–800 rpm, al buio/ dark room / 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 e/and 405 nm			
Calcoli/ Calculations / Auswertung	Software corrispondente/ Corresponding software / entsprechende Software			

LEGENDA SIMBOLI /SYMBOL LEGEND /SYMBOLLEGENDE

REF	Codice di riferimento o di ordine / reference or order code/ Referenz- oder Bestellnummer
LOT	Lotto / lot/ Charge
	Data di scadenza / expiration date/ Verfallsdatum
IVD	Per uso diagnostico in-vitro / For in-vitro diagnostic use/ Nur zur In-vitro-Diagnostik
CE	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 Sufficiente per 192 test / Sufficient for 192 tests/ Ausreichend für 192 Tests Sufficiente per 480 test / Sufficient for 480 tests/ Ausreichend für 480 Tests Sufficiente per 960 test / Sufficient for 960 tests/ Ausreichend für 960 Tests
H2O	Acqua distillata o deionizzata / Deionized or distilled water/ Destilliertes oder deionisiertes Wasser
RCNS	Ricostituire con il volume di liquido specificato / Reconstitute with specified volume of liquid/ Rekonstituieren mit
MP	Micropiastra / Microplate/ Mikrotiterplatte
CONJ E1	Coniugato E1/ Conjugate E1/ Konjugat E1
CONJ E2	Coniugato E2/ Conjugate E2/ Konjugat E2
CAL	Calibratori / Calibrators/ Kalibratoren
CONTROL	Controllo / Control/ Kontrollprobe
SUBS	Soluzione TMB / TMB Solution/ TMB Solution
STOP	Reagente Bloccante / Blocking Reagent/ Stop solution
DIL	Diluente dei campioni / Sample diluent / Proben Diluent
OD	Densità ottica / Optical density / Optische Dichte
WASH 20X	Soluzione Lavaggio, Concentrata 20X/ Washing Solution, 20X Concentrated/ Konzentrierte Waschlösung, 20X



Dia Lab Services srl

Legal site via del Babuino 51 – 00187 Rome (RM) – ITALY

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

Tel. +39 06 9111758 – Telefax +39 06 87462757

