





CE

## AllergenP Basic Kit

<b>REF</b>	PA1000	 96
<b>REF</b>	PA1003	 192
<b>REF</b>	PA1004	 480
<b>REF</b>	PA1005	 960
<b>REF</b>	PA1100	



**REAGENTI DEL KIT - KIT REAGENTS - KITREAGENZIIEN**

Reagenti / Reagents / Reagenzien	Quantità / Quantity / Menge				
	96 tests REF PA1000	192 tests REF PA1003	480 tests REF PA1004	960 tests REF PA1005	
<b>MP</b>	1 x 96	2 x 96	5 x 96	10 x 96	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>CONJ   E2</b>	1 x 13 mL	2 x 13 mL	5 x 13 mL	10 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>BUF   AS</b>	1 x 8 mL	2 x 8 mL	5 x 8 mL	10 x 8 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>WASH   20X</b>	1 x 50 mL	2 x 50 mL	5 x 50 mL	10 x 50 mL	Concentrata 20X / / 20X Concentrated / 20x konzentriert
<b>SUBS</b>	1 x 13 mL	2 x 13 mL	5 x 13 mL	10 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	1 x 13 mL	2 x 13 mL	5 x 13 mL	10 x 13 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig

**AllergenP IgE Set di Calibrazione / AllergenP IgE Calibration Set REF PA1100**

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

Reagenti / Reagents / Reagenz	Quantità / Quantity / Menge	
<b>CAL   0   ...   6</b>	7 x 1,3 mL	Pronti per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>CONTROL</b>	1 x 1,3 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
<b>CONJ   E1</b>	1 x 10 mL	Pronto per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig

**Allergeni Biotinilati / Biotinylated Allergens / biotinylierte Allergene**

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

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

**Sieri di Controllo / Control Sera / Kontrollseren***Da ordinare separatamente / To be ordered separately / Muss separat bestellt werden.*

<b>Reagenti / Reagents / Reagenzien</b>	<b>Quantità / Quantity / Menge</b>	<b>REF</b>
<b>Siero di Controllo Positivo-Inalanti / Positive Control Serum-Inhalants / Positivkontrolle - Inhalantien</b>	1 x 1 mL	<b>RA9249</b>
<b>Siero di Controllo Positivo-Alimenti / Positive Control Serum-Foods / Positivkontrolle - Nahrungsmittel</b>	1 x 1 mL	<b>RA9250</b>
<b>Siero di Controllo Negativo / Negative Control Serum / Negativkontrolle</b>	1 x 1 mL	<b>RA9251</b>

# 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

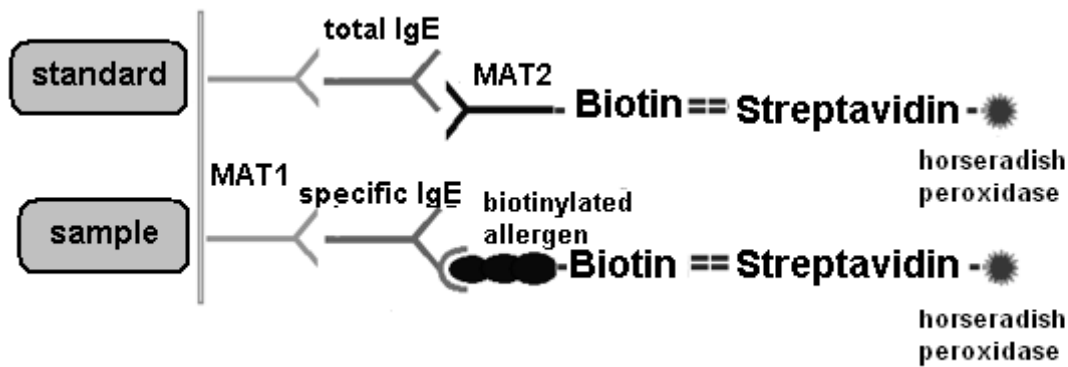
Le IgE partecipano sia alla comparsa che allo sviluppo di reazioni allergiche. Gli allergeni legati a questi anticorpi causano il rilascio di una serie di sostanze vasoattive da parte dei leucociti, che sono alla base dello sviluppo dei sintomi allergici. La definizione e la determinazione quantitativa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

## 2. PRINCIPIO DEL TEST

Il metodo impiegato nell'**AllergenP Basic kit** si basa sul sistema immunoenzimatico a cattura ed utilizza la stessa fase solida (pozzetti di microstrips 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, ciascuno in tanti replicati quanti sono gli allergeni da analizzare, 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, sia allergene-specifiche che non allergene-specifiche (Fig.1 – IgE Totali), (Fig.1 – allergene specifico).

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 nei pozzetti precedentemente incubati con i calibratori, mentre i diversi coniugati Allergene-Biotina vengono aggiunti nei corrispondenti pozzetti precedentemente incubati con i campioni. 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).

Gli allergeni biotinilati, invece, vengono legati dalle rispettive IgE specifiche, catturate durante la prima incubazione, per formare l'immunocomplesso fase solida ||-anti-IgE : IgE : Allergene-Biotina (Fig. 1 – allergene biotinilato).



**Fig. 1. Schema di reazione**

Dopo il lavaggio si aggiunge il Coniugato Streptavidina-Perossidasi in tutti i pozzetti. Questo reagisce sia con il coniugato anti-IgE-Biotina, rimasto legato nei pozzetti dei calibratori, che con il coniugato Allergene-Biotina, legato rimasto legato 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 dei calibratori, nei pozzetti incubati con i calibratori, e alla concentrazione delle IgE specifiche, nei pozzetti incubati con i campioni. La lettura delle densità ottiche viene effettuata mediante un lettore per micropiastre: i valori di assorbanza dei campioni sono direttamente proporzionali alla concentrazione delle IgE presenti nel campione. I risultati vengono ottenuti per interpolazione sulla curva di calibrazione e sono espressi sia in termini di unità che di classi di positività.

### 3. CONTENUTO DEL KIT (96 tests)

<b>MP</b>	<b>Micropiastra:</b> micropiastra da 12 strips, ciascuna composta da 8 pozzetti separabili (totale 96 pozzetti) rivestiti con anticorpi monoclonali anti-IgE.
<b>CONJ E2</b>	<b>Coniugato E2:</b> 13 mL per flacone di soluzione contenente streptavidina coniugata con HRP. Pronto per l'uso.
<b>BUF AS</b>	<b>Tampone di Dosaggio:</b> 8 mL per flacone di soluzione salina. Pronto per l'uso.
<b>STOP</b>	<b>Reagente Bloccante:</b> 13 mL per flacone di soluzione di HCl 1N. Pronto per l'uso.
<b>SUBS</b>	<b>Soluzione TMB:</b> 13 mL per flacone di soluzione 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina in tampone citrato contenente perossido di idrogeno. Pronto per l'uso.
<b>WASH 20X</b>	<b>Soluzione Lavaggio:</b> 50 mL per flacone di tensioattivo in soluzione salina tamponata, sufficiente per preparare 1000 mL di soluzione. <b>Concentrata 20X.</b>

#### 3.1 AllergenP IgE Set di Calibrazione

<b>0-6 CAL</b>	<b>Calibratori IgE:</b> 1.3 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. Pronti per l'uso.
<b>CONTROL</b>	<b>Siero di Controllo IgE:</b> 1,3 mL per flacone di soluzione a base proteica contenente concentrazioni note di IgE. Per il range esatto di concentrazioni di IgE vedere l'etichetta del flacone. Pronto per l'uso.
<b>CONJ E1</b>	<b>Coniugato E1:</b> 10 mL per flacone di soluzione contenente anticorpi monoclonali anti-IgE coniugati con biotina. Pronto per l'uso.

#### 3.2 Allergeni Biotinilati

**Allergene:** 3 mL per flacone di preparazione liquida o liofilizzata. Le informazioni relative al codice ed al nome di ciascun allergene sono descritte sull'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 numero necessario di strips sull'apposito alloggio. Riporre le strips inutilizzate nella busta richiudibile con minigrip e richiudere accuratamente.

#### **CAL CONTROL** Calibratori e Siero di Controllo

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

**BUF AS** Il Tampone di dosaggio è pronto per l'uso. Trasferire il Tampone nella vaschetta di contenimento considerando un volume di 0,5 mL per strip.

**CONJ E1** Il **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** Il **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 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, direttamente al momento della dispensazione, considerando un volume di 1.15 mL per strip.

Proteggere la Soluzione TMB dalla luce diretta.

**STOP** Il **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.

**Allergeni:** 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.

### 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 Basic kit e 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 al momento del ricevimento, preferibilmente nella confezione del kit originale, fino alla data di scadenza. 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:

- 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 , Soluzione TMB, Tampone di Dosaggio, Soluzione di Lavaggio concentrata e Reagente Bloccante: 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 con Calibratori e Siero di Controllo: a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- flaconi con Allergeni 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 ricostituzione o a -20 °C fino alla data di scadenza. Sono consentiti fino a un massimo di 4 scongelamenti.

**Nota:** *Se impiegati parzialmente, i kit devono essere utilizzati entro 9 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 ad 8 canali, con puntali monouso;
- incubatore / agitatore 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;
- 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 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 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.
- La Soluzione TMB deve essere incolore. Una colorazione della soluzione è possibile sotto la luce. 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 vanno manipolate con cautela. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di incidente lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
- 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, 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** **CONTROL** **BUF** **AS** 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, 91/689/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 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 T° 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, è suggerito 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. 43)

- A. Utilizzare il pozzetto **A1** per il bianco.
- B. Dispensare **50 µL** di Tampone di Dosaggio **BUF AS** in tutti i pozzetti, tranne il bianco.
- C. Pipettare **50 µL** di Calibratori **CAL**, Siero di Controllo **CONTROL** (in caso di utilizzo del controllo nel dosaggio) e **50 µL** di campioni dei pazienti 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.*

- D. Incubare per **60 minuti a 37°C**.
- E. Decantare, quindi lavare ciascun pozzetto 3 volte con **300 µL di Soluzione di Lavaggio** (preparata da **WASH 20X**). Assicurarsi che dopo l'ultimo ciclo di lavaggio i residui di soluzione siano stati completamente aspirati dai pozzetti.
- F. Pipettare **100 µL** di Coniugato **CONJ E1** in ogni pozzetto contenente i Calibratori e il Siero di Controllo (se utilizzato), ad eccezione del bianco.
- G. Pipettare **100 µL** di soluzione di allergeni in ogni pozzetto contenente i campioni.
- H. Incubare per **30 minuti a 37 °C**.
- I. Decantare, quindi lavare 3 volte ciascun pozzetto, come descritto nel punto E.
- J. Pipettare **100 µL** di Coniugato **CONJ E2** in ogni pozzetto, tranne il bianco.
- K. Incubare per **30 minuti a 37°C**.
- L. Decantare, quindi lavare ciascun pozzetto come descritto nel punto E.
- M. Pipettare immediatamente **100 µL** di Soluzione TMB **SUBS** in ogni pozzetto. Incubare al buio per **15 minuti a temperatura ambiente**.
- N. Pipettare **100 µL** di Reagente Bloccante **STOP** in tutti i pozzetti ed agitare per **1 – 2 minuti a temperatura ambiente**.
- O. 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 eseguita attraverso un'analisi computerizzata, calcolando la media in DO dei calibratori rispetto alle relative 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*

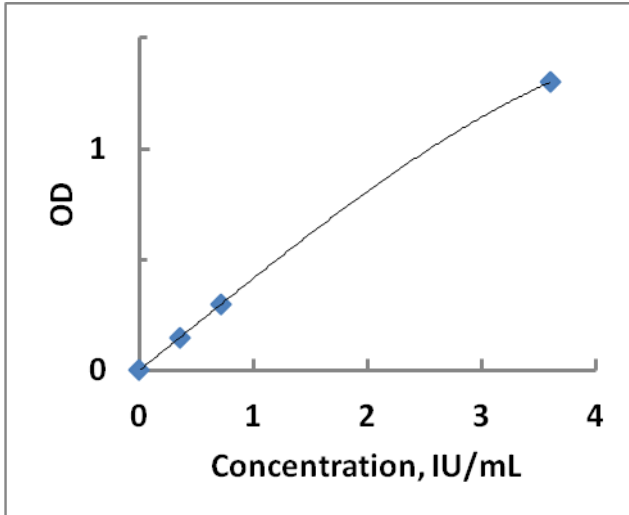


Figura 2A. Tipico esempio di curva standard a 450 nm

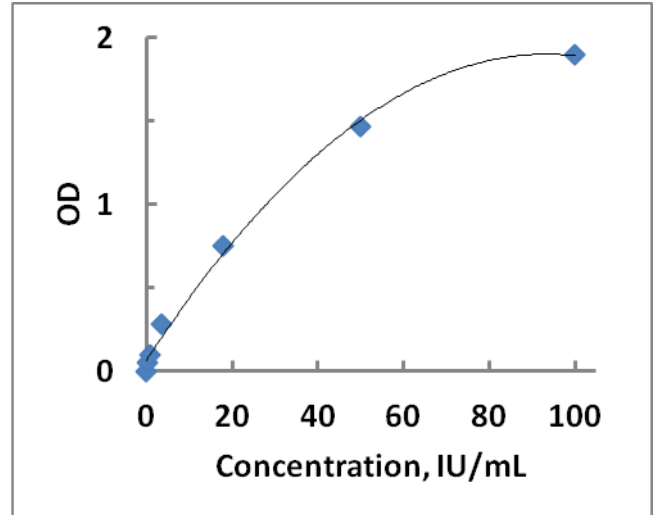


Figura 2B. Tipico esempio di curva standard a 405 nm

### 9.1 Affidabilità dei dati

I dati del test devono soddisfare i seguenti criteri:

- il valore della DO del bianco (nel pozzetto A1) deve essere  $\leq 0.090$  (solo per il dosaggio manuale);
- il valore della DO del Cal 0 deve essere  $< 0.06$ .

## 10. VALORI ATTESI

Concentrazioni di IgE, UI/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 Internazionale Campione Standard di Immunoglobulina E (IgE) di umana siero, NIBSC Riferimento 11/234.

### 11.2 Sensibilità Analitica (limite inferiore di rilevamento)

La sensibilità analitica dell'**AllergenP 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	
		DS	CV %
1	0.58	0.03	4.91
2	0.91	0.03	2.88
3	1.23	0.06	4.55
4	2.77	0.07	2.58
5	15.09	0.55	3.64
6	30.83	1.32	4.30
7	57.27	2.59	4.52
8	90.06	1.48	1.64

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

**REF RA9251** Siero di Controllo Negativo

**REF RA9249** Siero di Controllo Positivo-Inalanti

**REF RA9250** 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	DS	CV %
1	0.58	0.61	0.59	0.01	2.50
2	0.91	0.89	0.91	0.01	1.28
3	1.23	1.35	1.33	0.06	4.94
4	2.77	2.46	2.82	0.19	7.21
5	15.09	13.59	14.0	0.78	5.48
6	30.83	29.76	30.06	0.55	1.83
7	57.27	60.08	61.25	2.05	3.44
8	90.06	89.13	94.32	2.77	3.04

## 12. LIMITAZIONE DEL METODO

Un risultato negativo di **AllergenP 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 con 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 può accadere per determinanti

antigenici comuni in allergeni di varia natura. Tali indicazioni devono essere prese in considerazione quando il dosaggio viene utilizzato nelle indagini cliniche.

**13. LEGENDA SIMBOLI:** vedere pagina 42.



# ENZYME IMMUNOASSAY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF SPECIFIC IgE IN HUMAN SERUM

## FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY FOR PROFESSIONAL USE ONLY

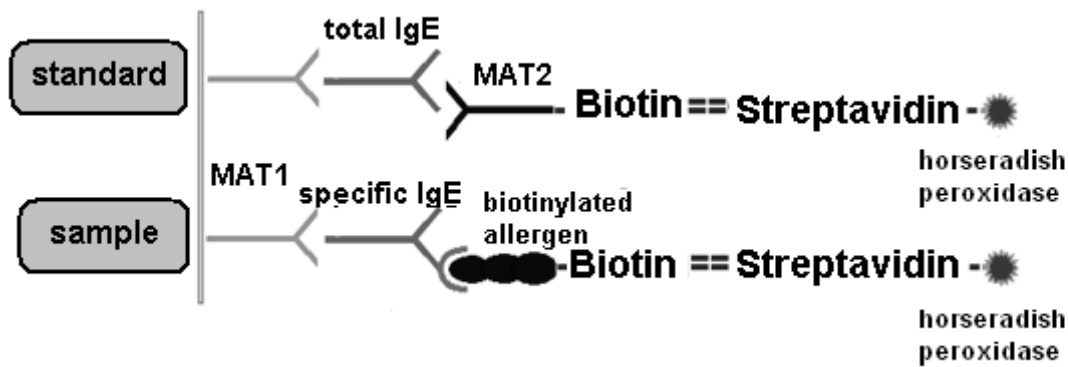
### 1. CLINICAL APPLICATIONS

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 diagnosis of allergic diseases and selection of an adequate therapy.

### 2. PRINCIPLE OF TEST

The **AllergenP Basic Kit** 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, each one in as many replicates as allergens to be analysed, 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, both allergen-specific and non-allergen-specific (Fig. 1 – total IgE), (Fig. 1 – specific allergen).

After an initial wash to eliminate any possible interference from other immunoglobulins, (eg. allergenspecific IgGs), the anti-IgE-Biotin conjugate is added to the wells that had previously been incubated with the calibrators, and the various Allergen-Biotin conjugates are added to the dedicated wells previously incubated with the samples. 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). The biotinylated allergens, on the other hand, are bound by the respective specific IgEs, captured during the first incubation, to form the solid-phase ||-anti-IgE : IgE : Allergen-Biotin immunocomplex (Fig. 1 – biotinylated allergen).



**Figure 1. Scheme of reaction**

After the wash the Streptavidin-Peroxidase conjugate is added to all the wells. This reacts both with the anti-IgE-Biotin conjugate, bound onto the wells of the calibrators, and with the Allergen-Biotin conjugate, bound onto the wells of 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 colour that develops is correlated to the concentration of the IgEs of the calibrators in the wells incubated with the calibrators and to the concentration of the specific IgEs in the wells incubated with the samples. The optical densities are read on a microplate reader; the sample absorbances are directly correlated to the concentration of IgE in the sample. The results are obtained by interpolation against the calibration curve and are expressed in terms of both units and classes of positivity.

### 3. CONTENT OF THE KIT (96 tests)

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-wells strips each (total 96 wells) coated with anti-IgE monoclonal antibodies.
<b>CONJ E2</b>	<b>Conjugate E2:</b> 13 mL per vial of solution containing streptavidin conjugated with HRP. Ready to use.
<b>BUF AS</b>	<b>Assay Buffer:</b> 8 mL per vial containing saline solution. Ready to use.
<b>STOP</b>	<b>Blocking Reagent:</b> 13 mL per vial of 1N HCl solution. Ready to use.
<b>SUBS</b>	<b>TMB Solution:</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 13 mL per vial of solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide. Ready to use.
<b>WASH 20X</b>	<b>Washing Solution:</b> 50 mL per vial of surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution. <b>20X Concentrated.</b>

### 3.1 AllergenP IgE Calibration Set

<b>0-6 CAL</b>	<b>IgE Calibrators:</b> 1.3 mL per vial of protein-based solution containing known IgE concentrations. For exact IgE concentrations, see vial labels. Ready to use.
<b>CONTROL</b>	<b>IgE Control Serum:</b> 1.3 mL per vial of protein-based solution containing known IgE concentrations. For exact range of IgE, see vial label. Ready to use.
<b>CONJ E1</b>	<b>Conjugate E1:</b> 10 mL per vial of solution containing anti-IgE monoclonal antibodies conjugated with Biotin. Ready to use.

### 3.2 Biotinylated Allergens

**Allergen:** 3 mL per vial of liquid or lyophilized solution. Information about code and name of an allergen is written 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 Calibrators and Control Serum**

Liquid Calibrators or Control Serum are ready for use.

**BUF AS** Assay Buffer is ready to use. Transfer Assay Buffer into the tray at 0.5 mL per strip.

**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 Wash 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 AK from direct light.

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

**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.

### 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 (Basic kit and Calibration Set) is printed on the box label, the 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 expiry 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, TMB Solution, Assay Buffer, 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 or at +2...+8°C for no more 4 weeks, in a firmly closed bottle;
- vials with Calibrators and Control Serum: at +2...+8 °C until expiration date;
- vials with liquid 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.

**Note:** If used partially, kits should be utilized within 9 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 (+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 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.
- 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.
- 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.
- TMB Solution and Blocking Reagent should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water and seek medical advice.
- 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** **CONTROL** **BUF AS** 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 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 application on RADIM and/or SEAC/NEXT LEVEL automatic instruments.

While using a non RADIM or SEAC/NEXT LEVEL 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 43)

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

B. Pipette **50 µL** of **BUF AS** into all the wells, except "blank well".

C. Pipette **50 µL** of **CAL**, **CONTROL** (in case of use of control in the assay) 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 the determination of each allergen-specific IgE.*

D. Incubate for **60 minutes** at **37°C**.

E. Decant, then wash each well 3 times with **300 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.

F. Pipette **100 µL** of **CONJ E1** into each well, that contains Calibrators and Control Serum (if used), except "blank well".

G. Pipette **100 µL** of Biotinylated Allergens into each well with tested samples.

- H. Incubate for **30 minutes at 37°C**.
- I. Decant, then wash each well 3 times, as described in the paragraph E.
- 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 as described in paragraph E.
- 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 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 the 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!*

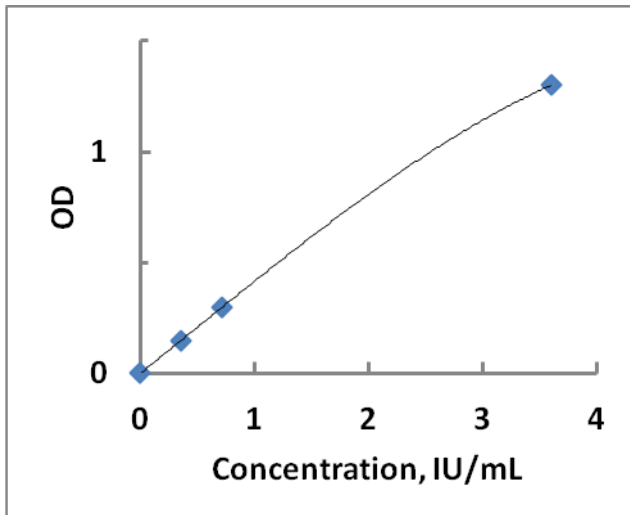


Figure 2A. Typical example of standard curve at 450 nm

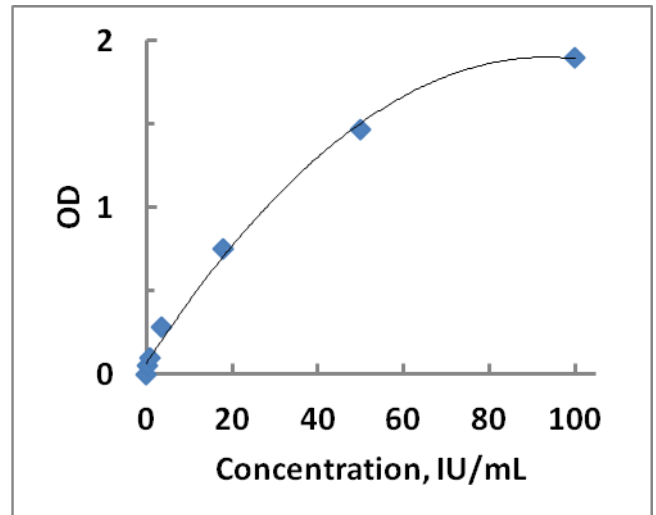


Figure 2B. Typical example of standard curve at 405 nm

### 9.1 Data Reliability (for OD Measured at 450 nm)

The test data should meet the following criteria:

- the OD value of blank (in well A1) must be  $\leq 0.090$  (only for manual assay);
- the OD value of Cal 0 should be  $< 0.06$ .

## 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 **AllergenP Basic kit**, that is the lowest detectable concentration that can be distinguished in the patients' sample, is 0.15 IU/mL. It was defined as the 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	0.58	0.03	4.91
2	0.91	0.03	2.88
3	1.23	0.06	4.55
4	2.77	0.07	2.58
5	15.09	0.55	3.64
6	30.83	1.32	4.30
7	57.27	2.59	4.52
8	90.06	1.48	1.64

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

- REF RA9251** Negative Control Serum
- REF RA9249** Positive Control Serum-Inhalants
- REF RA9250** 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	0.58	0.61	0.59	0.01	2.50
2	0.91	0.89	0.91	0.01	1.28
3	1.23	1.35	1.33	0.06	4.94
4	2.77	2.46	2.82	0.19	7.21
5	15.09	13.59	14.0	0.78	5.48
6	30.83	29.76	30.06	0.55	1.83
7	57.27	60.08	61.25	2.05	3.44
8	90.06	89.13	94.32	2.77	3.04

## 12. LIMITATION OF THE METHOD

A negative result of **AllergenP 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 42.

# 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

Die **AllergenP Kit** Methode basiert auf dem immunenzymatischen  $\mu$ -capture-System, wobei dieselbe Festphase – Wells von Mikrotiterstreifen, beschichtet mit anti-IgE-Antikörpern – für die Analyse der verschiedenen Allergene und zur Erstellung der Eichkurven verwendet wird. Die Kalibratoren werden in die Wells der ersten Mikrotiterstreifen, die Proben in die übrigen Wells pipettiert, wobei jede Probe mehrfach entsprechend der Anzahl der zu bestimmenden Allergene eingesetzt wird.

Während der ersten Inkubation binden die Anti-IgE-Antikörper in den Wells an das IgE der Proben (sowohl an allergenspezifische als auch an das unspezifische IgE).

Es folgt der erste Waschgang, um evtl. Interferenzen mit anderen Immunglobulinen, z.B. allergenspezifischem IgG, die evtl. im Serum vorhanden sind, zu vermeiden. Im nächsten Schritt wird Anti-IgE-Biotin-Konjugat in die Wells gegeben, die zuvor mit Kalibrator inkubiert wurden, während die verschiedenen Allergen-Biotin-Konjugate in die entsprechenden Proben-Wells pipettiert werden. Während dieser 2. Inkubation bindet das Anti-IgE-Biotin-Konjugat an das IgE der Kalibratoren, die an die Wells gebunden sind, um ein "Sandwich" aus Festphase- | -Anti-IgE : IgE : Anti-IgE-Biotin zu formen. (Abb. Reaktionsschema)

Die biotinierten Allergene binden hingegen an die entsprechenden spezifischen IgE, die während der ersten Inkubation gebunden wurden, und bilden einen Immunkomplex aus Festphase- | -Anti-IgE : IgE : Allergen-Biotin (Abb. Reaktionsschema.)

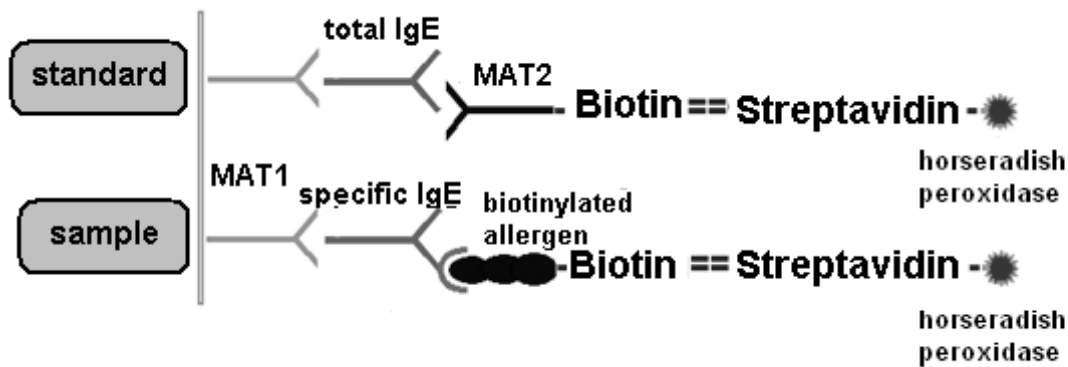


Abb. Reaktionsschema

Nach dem zweiten Waschgang wird das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in alle Wells pipettiert. Während der Inkubation wird sowohl das Anti-IgE-Biotin-Konjugat, das in den Kalibrator-Wells verblieben ist, als auch das Allergen-Biotin, das sich in den Proben-Wells befindet, durch das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gebunden. Im letzten Waschschrift werden nicht reagierende Antikörper entfernt. Anschließend ermöglicht die Zugabe von TMB den Nachweis des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das an den Festphasen-Immunkomplex gebunden wurde. Die entstehende Färbung korreliert mit der IgE-Konzentration in den Kalibrator-Wells und der Konzentration der spezifischen IgEs in den Proben-Wells. Die optischen Dichten (OD) werden auf einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Die Proben-ODs sind ein Maß für die IgE-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse werden durch Interpolation gegen die Eichkurve ermittelt und sowohl in Units als auch in Klassen angegeben.

### 3. INHALT DES KITS (96 tests)

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 brechbare Streifen mit jeweils 8 Wells (insgesamt 96 Wells), beschichtet mit monoklonalen Anti-IgE Antikörpern.
<b>CONJ   E2</b>	<b>Conjugate E2:</b> 13 ml pro Fläschchen mit einer Lösung, die mit HRP konjugiertes Streptavidin enthält. Konservierungsmittel: 0,015% Kathon. Gebrauchsfertig.
<b>BUF   AS</b>	<b>ASSAY BUFFER:</b> 8 ml pro Fläschchen mit Salzlösung. Gebrauchsfertig.
<b>STOP</b>	<b>BLOCKING REAGENT:</b> 13 ml pro Fläschchen mit 1N HCl-Lösung. Gebrauchsfertig.
<b>SUBS</b>	<b>TMB SOLUTION AK:</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 13 ml pro Fläschchen einer Lösung in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid. Gebrauchsfertig.
<b>WASH   20X</b>	<b>WASHING SOLUTION KIT E.W.:</b> 50 ml Tensid in gepufferter Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Waschlösung. 20X konzentriert.

#### 3.1 AllergenP IgE Calibration Set

<b>CAL   0   ...   6</b>	<b>IgE Calibrators:</b> 1,3 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.
<b>CONTROL</b>	<b>IgE Control Serum:</b> 1,3 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.
<b>CONJ   E1</b>	<b>Conjugate E1:</b> 10 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 | 0 | ... | 6 CONTROL Calibrators und Control Serum**

Flüssige Kalibratoren und Kontrollseren sind gebrauchsfertig.

**BUF | AS** Der Assaypuffer ist gebrauchsfertig. Pro Streifen in das Tray 0,5 ml Assaypuffer transferieren.

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

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

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

**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, Assay Buffer, 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 9 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 (37°C);
- Zubehör für manuelles oder automatisiertes Spülen der Wells;
- kalibrierter Mikrotiterplatten-Reader (405 nm, 450 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** **BUF AS** 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 NextLevel-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 43)

- A. **A1** als "Blank-Well".
- B. **50 µl** Assaypuffer **BUF | AS** in alle Wells außer "Blank" pipettieren.
- C. **50 µl** der Kalibratoren **CAL | 0 | ... | 6**, 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.

- D. **60 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
- E. 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.
- F. **100 µl** Konjugat **CONJ | E1** in alle Wells pipettieren, die Kalibratoren oder Kontrollen (falls vorhanden) enthalten, außer "Blank".
- G. **100 µl** Allergen in die zu testenden Proben-Wells pipettieren.
- H. **30 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
- I. Dekantieren und jedes Well 3-mal waschen, wie in Abschnitt E beschrieben.
- J. **100 µl** Konjugat **CONJ | E2** in alle Wells pipettieren, außer "Blank".
- K. **30 Minuten** bei **37°C** inkubieren.
- L. Dekantieren und jedes Well 3-mal waschen, wie in Abschnitt E 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 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.***

### **TYPISCHE STANDARDKURVE (BEISPIEL)**

***Nicht anstelle der tatsächlich ermittelten Daten verwenden.***

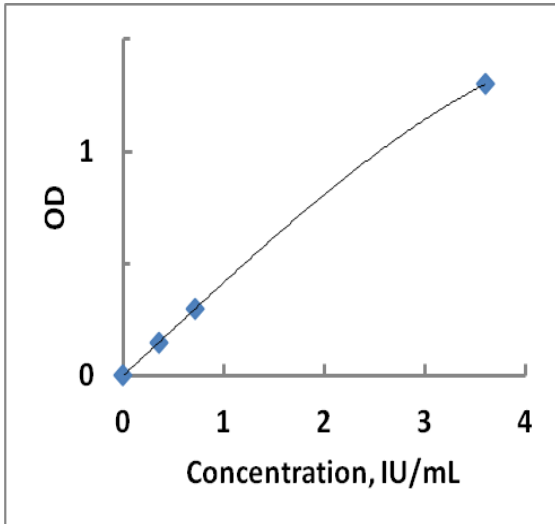


Abb. 2A. Typische Standardkurve bei 450 nm

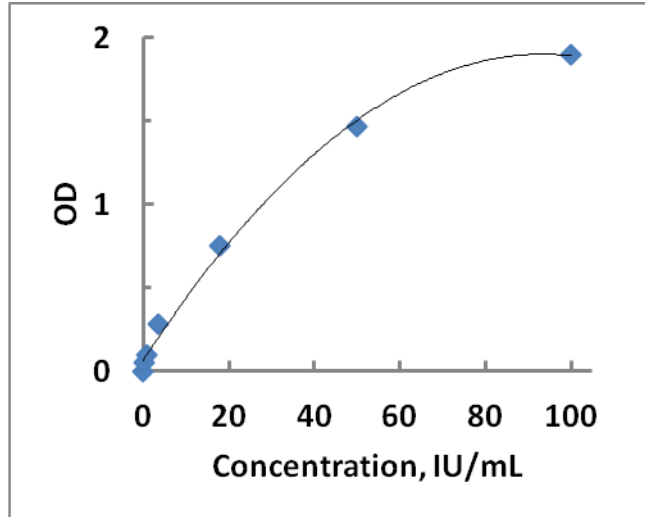


Abb. 2B. Typische Standardkurve bei 405 nm

## 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) muss  $\leq 0,090$  sein (nur beim manuellen Assay);
- Der OD-Wert für Cal 0 sollte  $<0,06$  sein.

## 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 **AllergenP 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	0,58	0,03	4,91
2	0,91	0,03	2,88
3	1,23	0,06	4,55
4	2,77	0,07	2,58
5	15,09	0,55	3,64
6	30,83	1,32	4,3
7	57,27	2,59	4,52
8	90,06	1,48	1,64

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	0,58	0,61	0,59	0,01	2,5
2	0,91	0,89	0,91	0,01	1,28
3	1,23	1,35	1,33	0,06	4,94
4	2,77	2,46	2,82	0,19	7,21
5	15,09	13,59	14,0	0,78	5,48
6	30,83	29,76	30,06	0,55	1,83
7	57,27	60,08	61,25	2,05	3,44
8	90,06	89,13	94,32	2,77	3,04



## 12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Ein negatives Ergebnis im **AllergenP Kit** gegen Antibiotika (Penicillin G, Penicillin V, Cephalosporin, 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 42.

**LEGENDA SIMBOLI /SYMBOL LEGEND**

<b>REF</b>	Codice di riferimento o di ordine / reference or order code/ Referenz- oder Bestellnummer
<b>LOT</b>	Lotto / lot/ Charge
	Data di scadenza / expiration date/ Verfallsdatum
<b>IVD</b>	Per uso diagnostico in-vitro / For in-vitro diagnostic use/ Nur zur In-vitro-Diagnostik
<b>CE</b>	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
<b>H2O</b>	Acqua distillata o deionizzata / Deionized or distilled water/ Destilliertes oder deionisiertes Wasser
<b>RCNS</b>	Ricostituire con il volume di liquido specificato / Reconstitute with specified volume of liquid/ Rekonstituieren mit
<b>MP</b>	Micropiastra / Microplate/ Mikrotiterplatte
<b>CONJ E1</b>	Coniugato E1/ Conjugate E1/ Konjugat E1
<b>CONJ E2</b>	Coniugato E2/ Conjugate E2/ Konjugat E2
<b>CAL</b>	Calibratori / Calibrators/ Kalibratoren
<b>CONTROL</b>	Controllo / Control/ Kontrollprobe
<b>SUBS</b>	Soluzione TMB / TMB Solution/ TMB Solution
<b>STOP</b>	Reagente Bloccante / Blocking Reagent/ Stop solution
<b>BUF AS</b>	Tampone di Dossaggio/Assay Buffer/ Assaypuffer
<b>OD</b>	Densità ottica / Optical density/ Optische Dichte
<b>WASH 20X</b>	Soluzione Lavaggio, Concentrata 20X/ Washing Solution, 20X Concentrated/ Konzentrierte Waschlösung, 20X

## SCHEMA DEL DOSAGGIO / ASSAY SCHEME

Reagenti/ Reagents/ Reagenzien	Pozzetti/ Wells	Bianco/ Blank/ Blank	CAL 0 ... 6 CONTROL	Campioni/ Samples/ Proben
BUF AS		–	50 µL	50 µL
CAL CONTROL		–	50 µL	–
Campioni/Samples/ Proben		–	–	50 µL
Incubazione/Incubation/ Inkubation N°1	60 min, +37 °C			
WASH 20X (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 300 µL			
CONJ E1		–	100 µL	–
Soluzione di allergeni/ Solution of allergens/ Lösung Allergene		–	–	100 µL
Incubazione/Incubation/ Inkubation N°2	30 min, +37 °C			
WASH 20X (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 300 µL			
CONJ E2		–	100 µL	100 µL
Incubazione /Incubation/ Inkubation N°3	30 min, +37 °C			
WASH 20X (diluita/diluted/ verdünnt)	3 x 300 µL			
SUBS		100 µL	100 µL	100 µL
Incubazione/Incubation/ Inkubation N°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 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**

