CE

Allergen ATotal IgE 2000

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

Instructions for use

(for manual test – see section 9,
for analyser "Alisei" test – see section 10)

IVD

Allergen ATotal IgE 2000 *(manual test)*	**RA1006**	Σ	*96*	REF
Allergen ATotal IgE 2000 *(analyser "Alisei" test)*	**RA1007**	Σ	*96*	REF

RADIM

dialab services

KIT REAGENTS - KITREAGENZIEN

Reagents / Reagenzien	Quantity/ Menge		
	RA 1006	RA 1007	
MP	1 x 96	1 x 96	Ready for use / Gebrauchsfertig
0–5 CAL	7 x 0.5 mL	9 x 0.5 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ	1 x 18 mL	1 x 18 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig
CONTROL	1 x 0.5 mL	2 x 0.5 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig
DIL	1 x 3 mL	1 x 3 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig
SUBS	1 x 14 mL	1 x 14 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig
WASH 20X	2 x 14 mL	1 x 50 mL	20X Concentrated / 20x konzentriert
STOP	1 x 14 mL	1 x 50 mL	Ready for use / Gebrauchsfertig

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

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

FOR PROFESSIONAL USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATIONS

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

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

2. PRINCIPLE OF TEST

EIA-Total IgE 2000 kit is a "sandwich" type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of IgE molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. IgE molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-IgE-peroxidase conjugate (Fig. 1). Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to the IgE level in sample. During incubation with substrate the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to the concentration of IgE in specimens or calibrators. The IgE concentration in the patient sample is determined from a standard curve that is created for each assay.

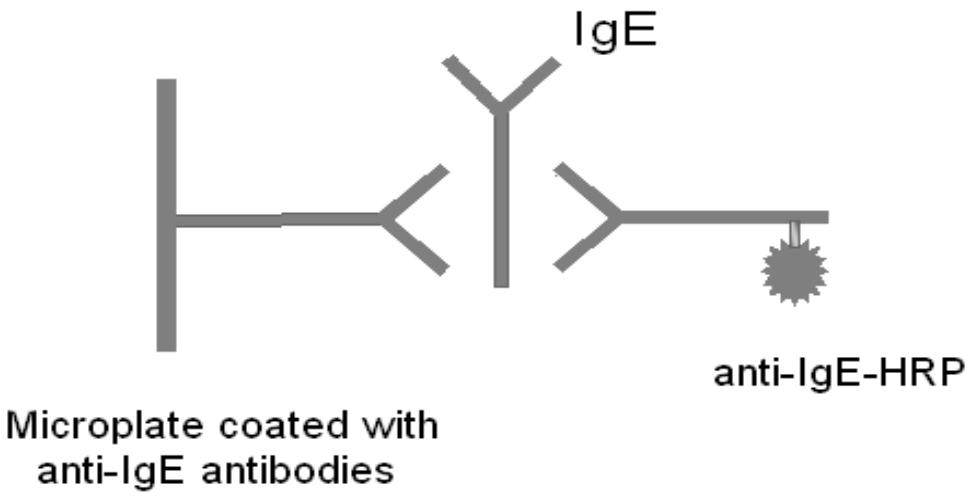

Fig. 1. Reaction scheme

3. CONTENT OF THE KIT

REF		RA1006	RA1007
MP	**Microplate:** 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-IgE monoclonal antibodies	1 pcs	1 pcs
0–6 CAL	**IgE Calibrators:** protein-based solution containing known IgE concentrations (**0 – 2000 IU/mL).** For exact IgE concentrations see vial labels	Cal 0 – 1 x 0,5 mL Cal 1 – 1 x 0,5 mL Cal 2 – 1 x 0,5 mL Cal 3 – 1 x 0,5 mL Cal 4 – 1 x 0,5 mL Cal 5 – 1 x 0,5 mL Cal 6 – 1 x 0,5 mL ready to use	Cal 0 – 1 x 0,5 mL Cal 1 – 1 x 0,5 mL Cal 2 – 2 x 0,5 mL Cal 3 – 1 x 0,5 mL Cal 4 – 1 x 0,5 mL Cal 5 – 2 x 0,5 mL Cal 6 – 1 x 0,5 mL ready to use
CONTROL	**IgE Control:** protein-based solution containing known IgE concentration. For exact range of IgE concentration, see vial labels	1 x 0,5 mL ready to use	2 x 0,5 mL ready to use
CONJ	**Conjugate:** solution containing anti-IgE monoclonal antibodies conjugated with HRP	1 x 18 mL ready to use	1 x 18 mL ready to use
DIL	**Sample Diluent:** protein-based solution	1 x 3 mL ready to use	1 x 3 mL ready to use
WASH P 20X	**Wash Solution P, 20X concentrated**: surfactant in buffered saline	2 x 14 mL for preparation of 2 x 280 mL of solution	1 x 50 mL for preparation of 1000 mL of solution
SUBS	**TMB Solution:** 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	1 x 14 mL ready to use	1 x 14 mL ready to use
STOP	**Blocking Reagent:** 1 N HCl solution	1 x 14 mL ready to use	1 x 50 mL ready to use

Note: *Extra vials of* CAL *2, 5 and* CONTROL *in RA 1007 are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for automatic analyser*.

4. REAGENT PREPARATION

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

MP Keep **microplate** at room temperature 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 firmly.

CAL **CONTROL**
Calibrators and control are ready to use.

CONJ Conjugate is ready to use.

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

14 mL of **WASH P** **20X** + 266 mL of water.

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUBS Substarte is ready to use. Protect **TMB Solution** from direct light.

STOP Blocking Reagent is ready to use.

TRIAL Working solution of **Trial** for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei” (see section 10). Prepare required volume of **Trial Solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL of **TRIAL** **5000X** + 9998 mL of water.

Mix thoroughly, avoid foaming.

5. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature (+18…+25 °C). Mix samples gently in order to ensure homogeneity.

If expected IgE concentration in the samples is higher than in calibrator 5 (or in calibrator 6), the samples should be diluted **20-fold** with **DIL Sample Diluent** manually according to instructions for use. The example of manual sample dilution as follows:

285 µL of **DIL Sample Diluent** + **15 µL** of serum sample, vortex or mix thoroughly.

6. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

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

EIA-Total IgE 2000 should be stored at +2…+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 15 days, including at +37 °C for no more than 1 day.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 6 months if stored at +2…+8 °C.

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

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2…+8 °C until the expiration date;
- vials with Calibrators, Control: at +2…+8 °C for no more than 6 months;
- vials with Conjugate, Sample Diluent, concentrated Wash Solution, Blocking Reagent and concentrated Trial Solution: at +2…+8 °C until the expiration date;
- vial with TMB Solution: at +2…+8 °C for no more than 6 months, protected from light;
- Wash Solution prepared for use: at room temperature (+18…+25 °C) for no more than 5 days or at +2…+8 °C for no more than 4 weeks, in a firmly closed bottle;
- Trial Solution prepared for use: at room temperature (+18…+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

To obtain reproducible results, follow the rules below:

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. Operator should follow the instruction for use closely in order to ensure reliable data.
- Use thoroughly cleaned glassware, free from contamination of metal ions or oxidating substances.
- Use deionized or distilled water stored in clean containers.
- Use new disposable tips for each sample and reagent to avoid any contamination among samples and solutions.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except TMB Solution, Blocking Reagent and Wash Solution.
- Do not use TMB Solution, Blocking Reagent and Wash Solution supplied by other vendors.
- Do not touch the bottom of the wells.
- 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.
- Reconstitute lyophilized reagents, if present, as described on the corresponding labels and Instructions for use. Any deviation in reagent use or wrong volumes, may affect the reliability of results obtained.
- Calibrators must be used for each new assay. It is also recommended to measure each time analyte concentration in the control.
- 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.
- Use a suitable method for the correct identification of patient samples. Incorrect identification may cause loss of specificity of analysis and wrong clinical results.

To avoid any personal or environmental hazards, follow the recommendations below:

- Use individual protective items (lab coats, gloves, goggles, etc.) while handling potentially infectious material and during the assay procedure.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- TMB Solution and Blocking Reagent (1 N HCL) should be handled with care, as well as the reagents containing Kathon (Conjugate, Calibrators, Control and Sample Diluent). Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can

guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents used for the assay must be considered potentially infectious. Therefore, the assay waste must be disposed of in accordance with established safety procedures.

- Avoid splashing and aerosol formation; in case of spilling, wash carefully with a 3% sodium hypochlorite solution and dispose of this cleaning liquid as potentially infectious waste.

As the kit contains irritant (CONJ DIL CAL CONTROL), 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.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative. Store serum samples at +2…+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze samples for longer storage (-20 °C and lower). Avoid repeated freezing.

9. MANUAL TEST

9.1. Equipment and materials required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator/shaker (+37 °C, shaking speed 400–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- microplate calibrated reader (450 nm, 405 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents using 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

9.2. Test Procedure (See assay scheme, page 38)

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

It is possible to do manual test in 2 options:

Option 1: If expected IgE concentration in the samples is lower than in calibrator 5, it is recommended to use CAL set: CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 3, CAL 4, CAL 5. If obtained IgE concentration in sample is higher than in CAL 5, the sample should be diluted (**see section 5**) and retested.

Option 2: If expected IgE concentration in the samples is higher than in calibrator 5, it is recommended to use CAL set: CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6. If obtained IgE concentration in sample is higher than in CAL 6, the sample should be diluted (**see section 5**) and retested.

Note: *It is allowed to use all CAL set (CAL 0 – CAL 6).*

A. Pipette: **150 µL** of **Conjugate** **CONJ** into each well **except wells A1-A2 (blank).**

B. Pipette: **20 µL** of **Calibrators** **CAL**, **Control** **CONTROL** and patients' samples in duplicates into the respective wells.
Leave wells A1-A2 empty for blank.

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

C Incubate strips for **60 minutes at +37 °C while shaking (400-800 rpm) or for 120 minutes at room temperature without shaking (previously pre-shake for 1-2 minutes at room temperature).**

D. Decant, then wash each well **5 times** with **300 µL** of **Wash Solution** (prepared from **WASH P** **20X**). Make sure that after the last washing cycle the residual buffer is thoroughly aspirated from the wells. It is advisable to use an automatic microplate washer.

E. Pipette **100 µL** of **TMB Solution** **SUBS** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature** (+18…+25 °C) **in the dark for 15-30 minutes,** depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (400-800 rpm) at +37 °C.**

F. Pipette **100 µL** of **Blocking Reagent** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing **TMB Solution.** Shake for **1-2 min at room temperature.**

G. Read OD at **450 nm (and at 405 nm, if it is used option 2) within 20 min.**

9.3. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.
Example:
OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;
OD (Cal 5) calculated = 2.28 - 0.06 = 2.22

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

- For **Option 1** use ODs of CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 3, CAL 4, CAL 5 **at 450 nm** to draw calibration plot (see typical standard curve, fig. 2).
  Determine the total IgE concentration of the sample.

- For **Option 2** use ODs of CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6 **at 450 nm** to draw calibration plot (see typical standard curve, fig. 3A) and ODs of CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6 **at 405 nm** to draw calibration plot (see typical standard curve, fig. 3B).

  Determine the total IgE concentration of the sample using:
- curve 3A, if OD of the sample at 450 nm is lower than OD of CAL 5.
- curve 3B, if OD of the sample at 450 nm is higher than OD of CAL 5.

Do not extrapolate IgE concentration in the sample if it is above the nominal value of CAL 5 (at 450 nm) or CAL 6 (at 405 nm) on standard curve. In this case the sample should be diluted 20-fold with **Sample Diluent** and retested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by dilution factor (20-fold).
If IgE concentration in 20-fold diluted sample still exceeds CAL 6 concentration proceed with next dilution or assign concentration "above 40000 IU/mL" to this sample.

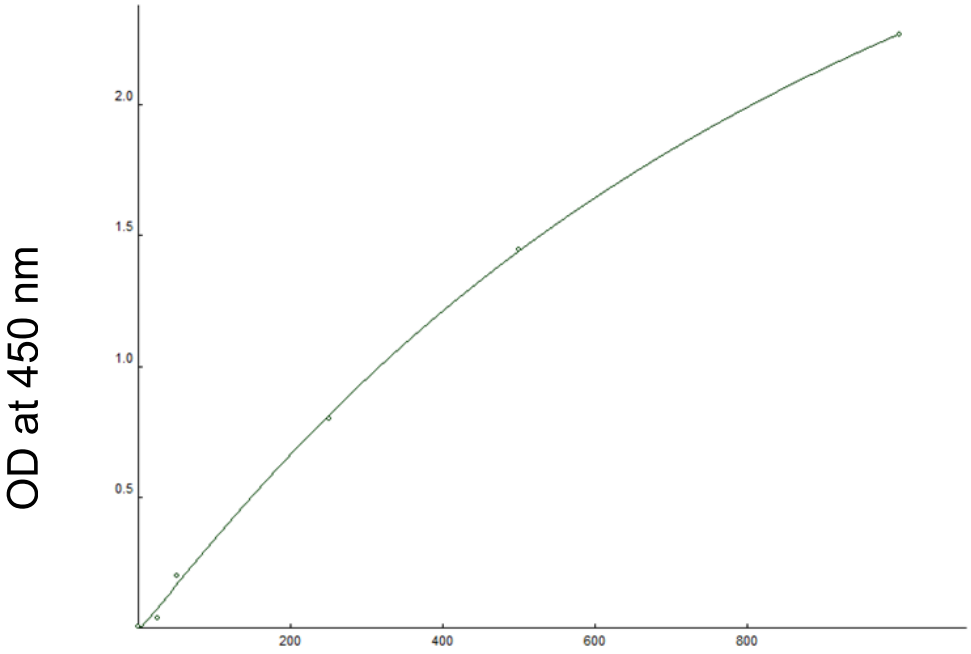

Fig. 2. Example of typical standard curve for Option 1.
Do not use for evaluation of real assay data.

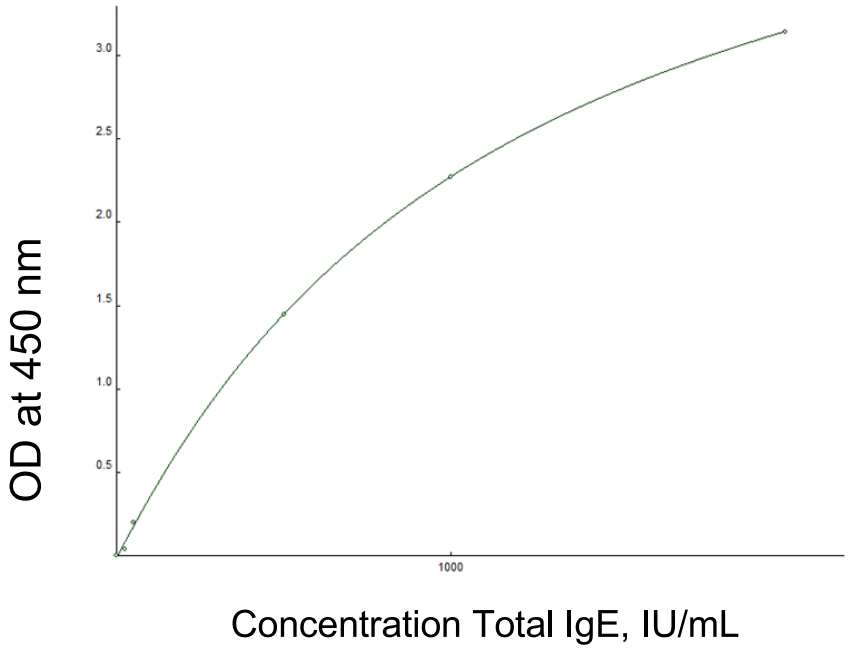

Fig. 3A. Example of typical standard curve for Option 2 **(at 450 nm)**.
Do not use for evaluation of real assay data.

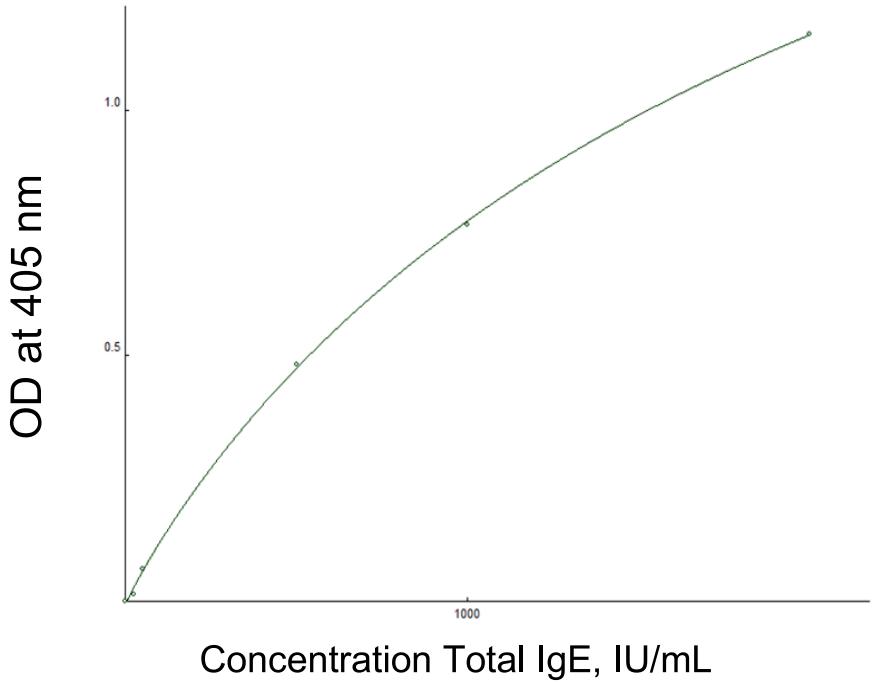

Fig. 3B. Example of typical standard curve for Option 2 **(at 405 nm)**.
Do not use for evaluation of real assay data.

9.4. Data Reliability

The data should meet the following criteria:

- average blank OD **at 450 nm** (in wells A1-A2) ≤0.09;
- average OD of Cal 5 **at 450 nm** ≥1.0 (after blank subtraction);
- average OD of Cal 6 **at 405 nm** ≥0.5 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the vial label.

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

10. AUTOMATIC TEST

10.1. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “ALISEI Q.S.”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL[1];
- **TRIAL** **5000X** Trial Solution, 5000X concentrated[2];
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

10.2. Test Procedure

We guarantee our kit applications on Seac/Next Level automatic instruments.

While using a non Seac/Next Level automatic instrument for microplates, it is under end user's responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

While using automatic analyser for the procedure, refer to analyser’s manual.

Note: *If the kit is not used at once, it is necessary to take reagents out of analyzer immediately after pipetting them into the wells of all plates, because liquid evaporates from vials. Put the reagents into refrigerator.*

10.2.1. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its corresponding manual.

The analysis on EIA analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of Total IgE 2000 determination is stored in analyser memory.

11. EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own reference range of IgE concentrations. The following reference range is recommended (see below):

Age (years)	Mean (IU/mL)
<1	0 - 15
1 - 6	0 - 60
6 - 10	0 - 90
10 - 16	0 - 200
adults	0 - 100

[1] Delivered by separate order
[2] Delivered by separate order

12. QUALITY CONTROL

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

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

13.1 Calibration-Traceability

EIA-Total IgE 2000 kit was calibrated against the WHO 3rd International Standard for human serum IgE, NIBSC code: 11/234.

13.2 Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of **EIA-Total IgE 2000** kit, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 8 IU/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of Calibrator 0 plus 2 SD.

13.3 Specificity

According to Product specification, provided by the supplier, no cross-reactivity was detected between anti-IgE monoclonal antibodies used in the assay and IgG, IgM and IgA.

13.4 Measurement Range

EIA-Total IgE 2000 kit was validated for measurement of IgE concentration within the concentration range (without dilution) of 8 - 2000 IU/mL.

13.5 Measurement Units

In **EIA-Total IgE 2000** kit the concentrations of calibrators are specified in IU/mL. To convert into ng/mL, multiply the concentration in IU/mL by 2.4.

13.6 Hook Effect

For **EIA-Total IgE 2000** kit **high dose hook effect** was not detected for concentrations up to 10 000 IU/mL. **High dose hook effect** was determined by spiking Calibrator 0 with antigen.

13.7 Intra- and Inter-Assay Variation (Precision)

Intra-assay CV was determined on 8 serum samples, each in 9 replicates. The results are shown below.

Sample	Mean IgE concentration,IU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
HS 1	24,3	1,84	7,6
HS 2	27,1	1,27	4,7
HS 3	57,9	1,56	2,7
HS 4	188,2	3,11	1,7
HS 5	167,4	3,39	2,0
HS 6	736,2	22,91	3,1
HS 7	1096,8	37,90	3,5
HS 8	1958,4	40,16	2,1

Inter-assay CV was determined on 8 serum samples, each in 9 replicates, that were assayed 3 times by different operators with 1-week interval.The results are shown below.

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
HS 1	25,7	24,3	24,8	0,71	2,8
HS 2	26,3	27,1	28,2	0,95	3,5
HS 3	60,2	57,9	55,1	2,55	4,4
HS 4	180,3	188,2	198,5	9,13	4,8
HS 5	171,8	167,4	165,1	3,40	2,0
HS 6	743,4	736,2	718,7	12,70	1,7
HS 7	1051,6	1096,8	1123,4	36,30	3,3
HS 8	1933,5	1958,4	1986,4	26,47	1,4

14. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. A qualified physician must consider all available clinical and laboratory findings to make proper diagnosis. Due to the heterogeneous nature of human antibodies there might be samples that do not maintain dilution parallelism.

15. SYMBOLS LEGEND: see page 39

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

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

1. KLINISCHE BEDEUTUNG

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

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

2. TESTPRINZIP

Das **Allergen A Total IgE 2000** Kit ist ein "Sandwich" Typ von Festphasen-Enzym-Immunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für verschiedene Epitope des IgE-Moleküls sind. Einer dieser Antikörper wird mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert; mit dem anderen wird die Innenfläche der Microwells beschichtet. IgE-Moleküle aus der Serumprobe binden sowohl an immobilisierte Antikörper als auch an das Anti-IgE-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1). Dann werden die Microwells mit Waschlösung gewaschen, um jedes Material zu entfernen, das nicht an die Innenfläche der Microwells gebunden ist. Die Menge des gebundenen Konjugats ist direkt proportional zum IgE-Gehalt in der Stichprobe. Während der Inkubation mit Substrat entwickelt sich die Farbe. Die Intensität der entwickelten Farbe korreliert mit der IgE-Konzentration von IgE in den Kalibratoren und Proben-Wells. Die IgE-Konzentration in den Proben wird aus der Eichkurve abgelesen, die für jeden Assay erstellt wird.

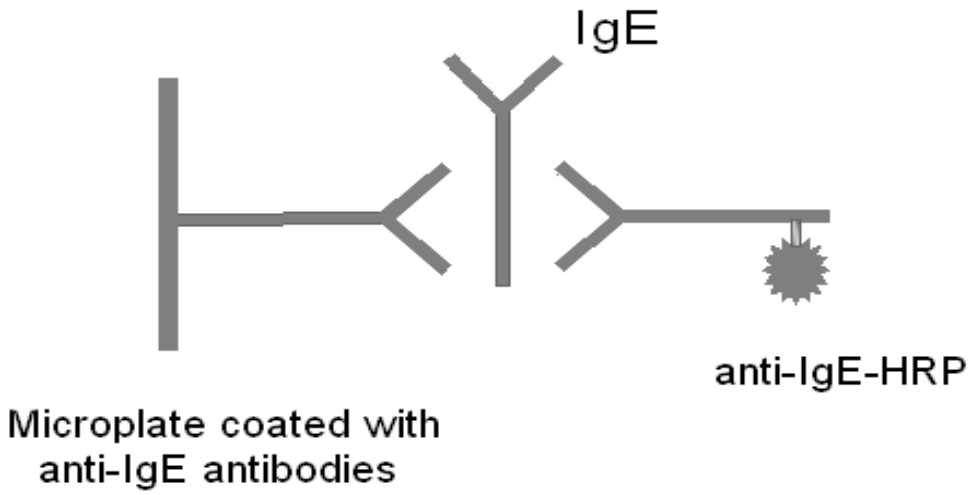

Abb. 1. Reaktionsschema

3. INHALT DES KITS

REF		RA1006	RA1007
MP	**Microplate:** Mikrotiterplatte mit 12 brechbaren 8-Well-Streifen (insgesamt 96 Wells), beschichtet mit monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern.	1 Stück	1 Stück
CONJ	**Conjugate:** Die Lösung enthält monoklonale Anti-IgE-Antikörper, konjugiert mit HRP.	1 x 18 mL Gebrauchsfertig.	1 x 18 mL Gebrauchsfertig.
0–6 CAL	**IgE Calibrators:** Lösung auf Proteinbasis mit IgE in bekannten Konzentrationen Gebrauchsfertig.	Cal 0 – 1 x 0,5 mL Cal 1 – 1 x 0,5 mL Cal 2 – 1 x 0,5 mL Cal 3 – 1 x 0,5 mL Cal 4 – 1 x 0,5 mL Cal 5 – 1 x 0,5 mL Cal 6 – 1 x 0,5 mL	Cal 0 – 1 x 0,5 mL Cal 1 – 1 x 0,5 mL Cal 2 – 2 x 0,5 mL Cal 3 – 1 x 0,5 mL Cal 4 – 1 x 0,5 mL Cal 5 – 2 x 0,5 mL Cal 6 – 1 x 0,5 mL
CONTROL	**IgE Control:** Lösung auf Proteinbasis mit bekannter IgE-Konzentration.	1 x 0,5 mL Gebrauchsfertig	2 x 0,5 mL Gebrauchsfertig
DIL	**Sample Diluent:** Lösung auf Proteinbasis.	1 x 3 mL Gebrauchsfertig	1 x 3 mL Gebrauchsfertig
WASH 20X	**Washing Solution Kit E.W.:** Tensid in gepufferter Salzlösung, 20fach konzentriert.	2 x 14 mL zur Vorbereitung von 2 x 280 mL Lösung	1 x 50 mL zur Vorbereitung von 1000 mL Lösung
STOP	**Stop Solution:** 1N HCL-Lösung.	1 x 14 ml Gebrauchsfertig.	1 x 50 ml Gebrauchsfertig.
SUB	**TMB Solution AK:** 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Lösung in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid.	1 x 14 ml Gebrauchsfertig.	1 x 14 ml Gebrauchsfertig.

Hinweis: *Zusätzliche Fläschchen von CAL 2, 5 und CONTROL bei RA1007 werden für die Neukalibrierung auf Referenzkalibrierungskurve zur Verfügung gestellt. Ausführliche Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den automatischen Analyser.*

4. 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** Kalibratoren und Kontrollen

Die Kalibratoren und Kontrollen sind gebrauchsfertig.

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

5 mL **WASH** **20X** + 95 mL destilliertes Wasser.

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

SUBS **Substrate** ist gebrauchsfertig. Das Substrat vor direktem Licht schützen.

STOP **STOP** ist gebrauchsfertig.

5. PROBENVORBEREITUNG

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

Falls die erwartete Total IgE-Konzentration in den Proben höher als Kalibrator 5 (oder in Kalibrator 6) ist, sollten die Proben **20fach** mit **DIL** **Sample Diluent** entsprechend der Gebrauchsanweisung verdünnt werden. Beispiel für eine manuelle Probenverdünnung:

285 µL **DIL** **Sample Diluent** + **15 µL** Serumprobe,

Gründlich vortexen oder mischen.

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS

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

Der **EIA-Total IgE 2000** Kit sollte nach Erhalt bei 2-8°C, bis zum auf dem Verpackungsetikett angegebenen Verfallsdatum, möglichst in der Originalpackung gelagert werden.

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

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 18 Monate.

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

- nicht benötigte Streifen: fest verschlossen in einem wieder verschließbaren Plastikbeutel bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum;
- ungeöffnete Fläschchen mit Calibrators und Controls bei 2-8°C bis zu 6 Monaten;
- Fläschchen mit TMB Solution: bei 2-8°C bis zu 6 Monaten, das Substrate vor direktem Licht schützen;
- Fläschen mit Conjugate, Sample Diluent, konzentrierter Wash Solution, 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.

7. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Für fehlerfreie und reproduzierbare Ergebnisse müssen folgende Regeln eingehalten werden:

- Dieser Kit dient nur zur In-vitro-Diagnostik. Um zuverlässige Ergebnisse sicherzustellen sollte der Benutzer die Gebrauchsinformationen genau beachten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Kit gültig.
- Mischen Sie keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen, außer Substrat, Stopplösung und Waschlösung.
- Verwenden Sie keine Reagenzien über das Verfallsdatum hinaus. Beachten Sie die Angaben zur Stabilität rekonstituierter Reagenzien.
- Lagern oder belassen Sie die Reagenzien und Proben nicht bei hohen Temperaturen oder in Bereichen mit möglicher Kontamination.
- Verwenden Sie keine TMB-Lösung, Stopp- oder Waschlösung von anderen Herstellern.
- Verwenden Sie gründlich gesäuberte Glasbehälter, frei von Metallionenkontamination oder oxidierenden Substanzen.
- Verwenden Sie destilliertes oder deionisiertes Wasser, das in absolut sauberen Behältern gelagert wurde.
- Vermeiden Sie sorgfältig eine Kontamination der Proben und Lösungen untereinander; aus diesem Grunde sollten Einwegspitzen für jede Probe und jedes Reagenz verwendet werden.
- Berühren Sie nicht den Boden der Wells.
- Für jeden einzelnen Testansatz müssen Kalibratoren gemessen werden. Es wird auch empfohlen, jedes Mal Kontrollen zu messen.
- Rekonstituieren Sie lyophilisierte Reagenzien, falls vorhanden, wie auf den Etiketten und in den Gebrauchsanweisungen angegeben. Jede Abweichung im Reagenziengebrauch oder falsche Volumina können die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinflussen.
- Falls der Kit in mehreren Testansätzen verwendet wird, ist es nötig, die Reagenzien sofort nach dem Pipettieren in die Wells aus dem Gerät zu nehmen, weil Flüssigkeit aus den Fläschchen verdunstet. Stellen Sie die Reagenzien in einen Kühlschrank.
- Zur Rekalibration dürfen erhaltene Standardwerte einer anderen Kit-Lot nicht verwendet werden.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein, eine leichte Färbung ist akzeptabel. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung auf das Substrat.
- Verwenden Sie eine geeignete Methode für die korrekte Identifizierung von Patientenproben. Eine falsche Probenidentifizierung kann zu einer niedrigeren Spezifität des Systems und falschen klinischen Ergebnissen führen.

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

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

Der Kit enthält Reizmittel (CONJ DIL CAL CONTROL), deshalb sind folgende Vorsichtsmaßnamen zu beachten:

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

8. 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.

9. MANUELLE TESTDURCHFÜHRUNG (siehe auch Assayschema, Seite 38)

9.1 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES ZUBEHÖR UND MATERIALIEN (nicht enthalten im Kit)

- Ein Set kalibrierte, variable Präzisionspipetten mit Einwegspitzen;
- Kalibrierte, variable 8-Kanal-Präzisionspipette mit Einwegspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (37°C, shaking speed 400–800 rpm);
- Zubehör für manuelles oder automatisiertes Spülen der Wells;
- kalibrierter Mikrotiterplatten-Reader (450 nm, 405 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).

9.2 Testdurchführung (Siehe Testschema, Abschnitt 9.4)

Für die interne Qualitätskontrolle ist es ratsam, Kontrolserum in bekannter Konzentration zu verwenden, die die Überwachung der Assay-Leistungen ermöglicht. Es ist möglich, manuelle Tests in 2 Optionen durchzuführen:

Option 1: Wenn die erwartete IgE-Konzentration in den Proben niedriger ist als in Kalibrator 5, wird empfohlen, CAL-Set zu verwenden: CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 3, CAL 4, CAL 5. Wenn die erhaltene IgE-Konzentration in der Probe höher ist als in CAL 5, sollte die Probe verdünnt (siehe Abschnitt 5) und erneut getestet werden.

Option 2: Wenn die erwartete IgE-Konzentration in den Proben höher ist als in Kalibrator 5, wird empfohlen, CAL-Set zu verwenden: CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6. Wenn die erhaltene IgE-Konzentration in der Probe höher ist als in CAL 6, sollte die Probe verdünnt (siehe Abschnitt 5) und erneut getestet werden.

Hinweis: *Es ist erlaubt, alle CAL-Sets (CAL 0 – CAL 6) zu verwenden.*

A. 150 µl Conjugate **CONJ** in alle Wells außer **A1-A2 (blank).**
B. 20 µl Kalibratoren **CAL**, **Kontrollen** **CONTROL** and Patientenproben in Duplikaten in die entsprechenden Wells pipettieren.

A1 und A2 als Blank Well verwenden.

Hinweis: *Die Gesamtzeit der Abgabe darf 15 Minuten nicht überschreiten, da das Testergebnis sonst unzuverlässig sein kann, da die Inkubationszeit für verschiedene Proben erheblich variiert.*

C 60 Minuten bei +37 C und unter Schütteln (400-800 rpm) oder für **120 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schütteln (zuvor vorschütteln für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur)** inkubieren.

D. Dekantieren und jedes Well 5 mal mit 300 µl Waschlösung (vorbereitet aus **WASH P** **20X**) waschen. Stellen Sie sicher, dass nach dem letzten Waschzyklus der Restpuffer gründlich aus den Wells abgesaugt wird. Es ist ratsam, einen automatischen Washer zu verwenden.

E. 100 µl TMB Solution SUBS in jedes Well pipettieren (inclusive Blank), 15-30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (+18…+25 °C) inkubieren, abhängig von der Farbintensität, oder 10 Minuten unter Schütteln (**400-800 rpm) bei +37 C.**

F. 100 µL Blocking Reagent STOP in alle Wells pipettieren und die Wells für 1-2 min bei Raumtemperatur schütteln.

G. Die ODs bei **450 nm** (und bei 405 nm, wenn Option 2 verwendet wird) **innerhalb von 20 min. messen.**

9.3 Datenverarbeitung

Wenn der Reader nicht mit dem Substrat-Blanks A1-A2 auf Null eingestellt werden kann, subtrahieren Sie den mittleren OD-Wert der Wells A1-A2 von allen OD-Werten vor weiteren Berechnungen.

Beispiel:

OD (Cal 5) gemessen = 2,28 und OD (leer) = 0,06;

OD (Cal 5) berechnet = 2,28 - 0,06 = 2,22

Die Datenverarbeitung erfolgt durch eine computergestützte Analyse zur Berechnung des mittleren OD von Kalibratoren im Vergleich zu ihren jeweiligen Total-IgE-Konzentrationen mit 4PL-Passung.

Option1: Verwenden Sie für Option 1 ODs von CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 3, CAL 4, CAL 5 bei 450 nm, um ein Kalibrierdiagramm zu zeichnen (siehe typische Standardkurve, Abb. 2). Bestimmen Sie die gesamte IgE-Konzentration der Probe.

Für Option 2 verwenden Sie ODs von CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6 bei 450 nm, um Kalibrierdiagramme zu zeichnen (siehe typische Standardkurve, Abb. 3A) und ODs von CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6 bei 405 nm, um

ein Kalibrierdiagramm zu zeichnen (siehe typische s. 3A) und ODs von CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 4, CAL 5, CAL 6 bei 405 nm, um ein Kalibrierdiagramm zu zeichnen (siehe typische Standardkurve, Abb. 3B).

Bestimmen Sie die gesamte IgE-Konzentration der Probe mit:
Kurve 3A, wenn die OD der Probe bei 450 nm niedriger ist als OD von CAL 5.
Kurve 3B, wenn die OD der Probe bei 450 nm höher ist als OD von CAL 5.

Jede Extrapolation der Standardkurve auf die IgE-Konzentration oberhalb des Nennwertes des Kalibrators 5 (bei 450nm) oder CAL 6 (bei 405 nm) ist verboten. In diesem Fall sollte die Probe 20-fach mit Probenverdünnung verdünnt und erneut getestet werden. Multiplizieren Sie die gemessene Konzentration der vorverdünnten Proben mit dem Verdünnungsfaktor (20-fach).

Bleibt die Konzentration der 20-fach verdünnten Probe über der Konzentration des CAL 1-5, um einer Probe eine Konzentration "über 40000 I.E./ml" zuzuweisen.

TYPISCHE STANDARDKURVE (BEISPIEL)
Nicht anstelle der tatsächlich ermittelten Daten verwenden.

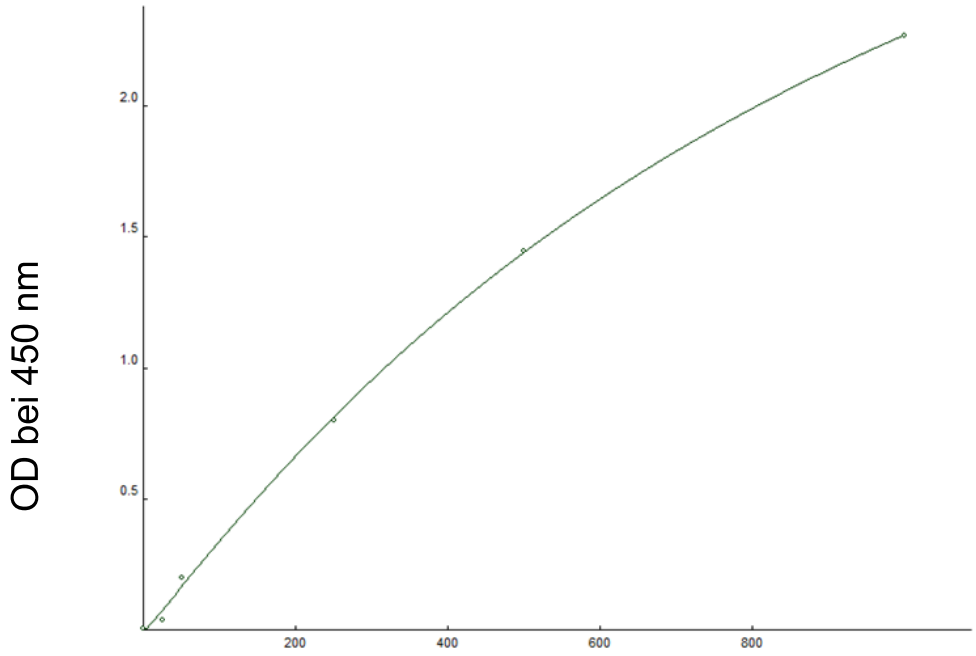

Abb. 2. Typisches Beispiel einer Standardkurve für Option 1

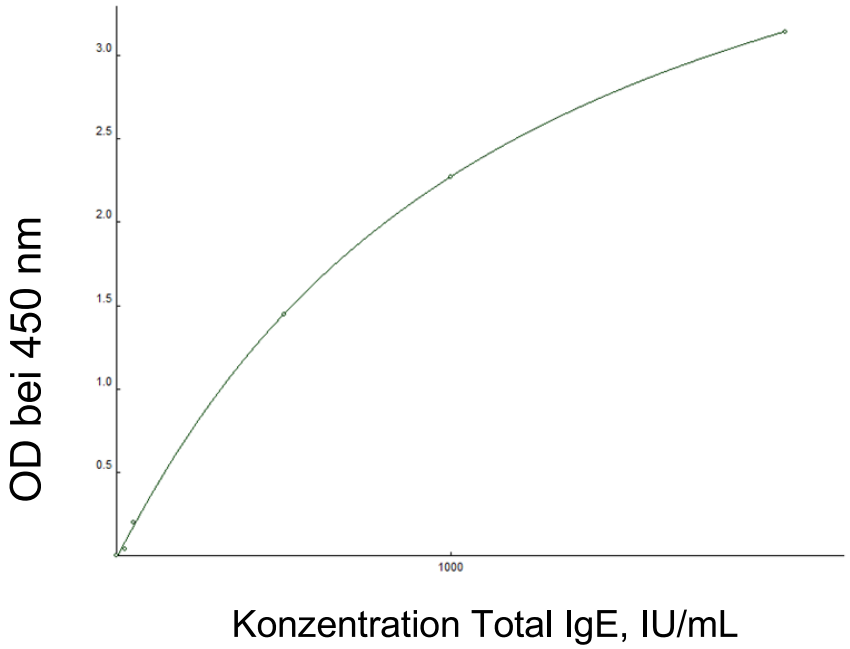

Abb. 3A. Beispiel für die typische Standardkurve für Option 2 **(bei 450 nm).**
Nicht für die Auswertung von echten Assay-Daten verwenden.

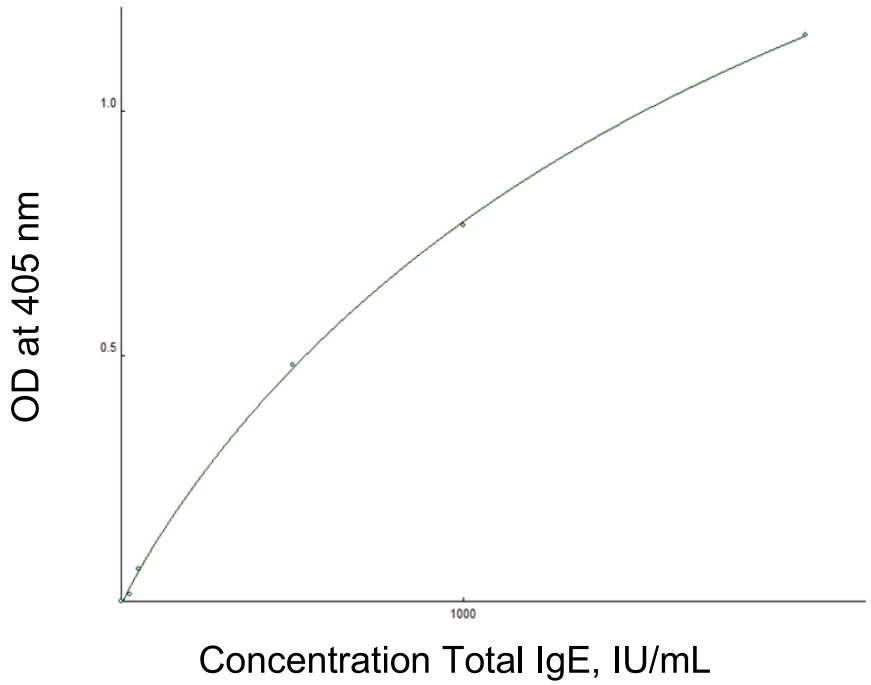

Abb. 3B. Beispiel für die typische Standardkurve für Option 2 **(bei 405 nm).**
Nicht für die Auswertung von echten Assay-Daten verwenden.

Datenzuverlässigkeit

Die Daten sollten die folgenden Kriterien erfüllen:

1. durchschnittliche OD des Blank bei 450 nm (in Well A1-A2) <0.09;
2. durchschnittliche OD von Cal 5 bei 450 nm ≥1.0 (nach Subtraktion des Blank).
3. durchschnittliche OD von Cal 6 bei 405 nm ≥0.5 (nach Subtraktion des Blank).
4. die Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Akzeptanzbereichs liegen, der auf dem Fläschchen-Etikett angegeben ist.

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

10 AUTOMATISCHE TESTDURCHFÜHRUNG AUF ELISA-ANALYSERN

10.1 Zusätzlich benötigtes Zubehör und Materialien (nicht enthalten im Kit)

- Automatic Analyser für ELISA Kits auf MTPs (Analyser “ALISEI Q.S.” oder “PersonalLAB” oder andere);
- Mehrzweck-Polypropylenrohre 12 x 75 , Volumen 5,5 ml[3];
- TRIAL 5000X Trial Lösung, 5000X konzentriert[4];
- entionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Latex- oder Kunststoffhandschuhe.

10.2 Testdurchführung

Wir garantieren unsere Kit-Anwendungen auf Seac/Next Level automatischen Instrumenten. Bei der Verwendung eines automatischen Instruments für Mikroplatten, das nicht von Seac/Next Level stammt, liegt es in der Verantwortung des Endbenutzers, sicherzustellen, dass es entsprechend für ELSIA-Kits. Bitte lesen Sie hierzu das Handbuch des Analysers.

Hinweis: Wenn das Kit nicht sofort verwendet wird, ist es notwendig, Reagenzien sofort nach dem Pipettieren aller Platten aus dem Analyser zu nehmen, da Flüssigkeit aus Fläschchen verdunstet. Die Reagenzien in den Kühlschrank stellen.

10.2.1 Assay-Verfahren für automatische Tests

[3] Lieferung durch gesonderten Auftrag

[4] Lieferung durch gesonderten Auftrag

Während der Verwendung des Analysers "Alisei" beziehen Sie sich auf das entsprechende Handbuch. Die Analyse des UVP-Analysators "Alisei" erfolgt vollautomatisch: Pipettieren von Reagenzien, Waschen, Inkubation, OD-Messung, Analyse der Ergebnisse. Das Programm zur Abarbeitung AllergenA Total IgE 2000 wird in der Software des ELISA-Analysers gespeichert.

11. ERWARTETE WERTE

Es wird jedem Labor dringend empfohlen, seinen eigenen Referenzbereich der IgE-Konzentrationen zu bestimmen.
Der folgende Referenzbereich wird empfohlen (siehe unten):

Alter (Jahre)	Mittelwert (IU/mL)
<1	0 - 15
1 - 6	0 - 60
6 - 10	0 - 90
10 - 16	0 - 200
Erwachsene	0 - 100

12. QUALITÄTSKONTROLLE

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

13. TESTCHARAKTERISTIKA

13.1 Kalibrierung-Traceability

EIA Total IgE 2000 wurde gegen den 3. WHO Internationalen Standard Immunoglobulin E (IgE), NIBSC code: 11/234 kalibriert.

13.2 Spezifität

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

13.3 Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität des **EIA-Total IgE 2000**, d.h. die niedrigste nachweisbare Konzentration, die bei Patientenproben unterschieden werden kann, liegt bei 8 IU/ml. Sie ist definiert als der Mittelwert von 10 Replikaten des Calibrator 0 plus 2 SD.

13.4 Messbereich

EIA-Total IgE 2000 Kit wurde für die Messung der IgE-Konzentration im Konzentrationsbereich (ohne Verdünnung) von 8 - 2000 I.E./ml validiert.

13.5 Maßeinheiten

In **EIA Total IgE 2000** Kit sind die Konzentrationen von Kalibratoren in IU/mL angegeben. Um in ng/ml umzuwandeln, multiplizieren Sie die Konzentration in I.E./ml mit 2,4.

13.6 Hook-Effekt

Für das **EIA-Total IgE 2000** Kit wurde kein **hochdosierter Hookeffekt** für Konzentrationen bis 10 000 I.E./ml nachgewiesen. **Die hochdosierte Hook-Wirkung** wurde durch Spiking von Kalibrator 0 mit Antigen bestimmt.

13.7. Intra- und Inter-assay

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

Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml	Intra-assay CV	
		SD	CV%
1	24,3	1,84	7,6
2	27,1	1,27	4,7
3	57,9	1,56	2,7
4	188,2	3,11	1,7
5	167,4	3,39	2,0
6	736,2	22,91	3,1
7	1096,8	37,90	3,5
8	1958,4	40,16	2,1

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

Probe	mittlere IgE-Konzentration, IU/ml			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	25,7	24,3	24,8	0,71	2,8
2	26,3	27,1	28,2	0,95	3,5
3	60,2	57,9	55,1	2,55	4,4
4	180,3	188,2	198,5	9,13	4,8
5	171,8	167,4	165,1	3,40	2,0
6	743,4	736,2	718,7	12,70	1,7
7	1051,6	1096,8	1123,4	36,30	3,3
8	1933,5	1958,4	1986,4	26,47	1,4

14. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

15. SYMBOLLEGENDE: Seite 39

ASSAY SCHEME / ASSAY SCHEMA

Wells / Reagents / Reganzien	Blank	CAL / CONTROL	Samples / Proben
CONJ	–	150 µL	150 µL
CAL / **CONTROL**	–	20 µL	–
Samples / Proben	–	–	20 µL
Incubation No.1 / Inkubation Nr.1	60 min, +37 °C, 400–800 rpm **or / oder** 120 min, +18…+25 °C, without shaking *(previously pre-shake for 1-2 minutes at +18…+25 °C)*		
WASH P **20X** (diluted, verdünnt)	5 x 300 µL		
SUBS	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2 / Inkubation Nr.2	15-30 min, +18…+25 °C in the dark **or** 10 min, +37 °C, 400-800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Mixing / Mischen	1–2 min, +18…+25 °C		
ODs measuring / OD Messung	450 nm, 405 nm		
Calculations / Kalkulation	Corresponding software / entsprechende Software		

SYMBOL LEGEND/ LEGENDE

REF	Reference code / Referenz- oder Bestellnummer
LOT	Lot / Charge
	Expiration date / Verfallsdatum
IVD	For in-vitro diagnostic use / Nur zur In-vitro-Diagnostik
CE	CE marking according to IVD guidelines 98/79/EC / Markierung entsprechend der IVD Richtlinie 98/79/EG
+2 +8	Keep at +2…+8 °C / Lagerung bei 2-8°C
	Manufacturer / Hersteller
	Date of Manufacture / Herstellungsdatum
	Biohazard / Biorisiko
	Consult instructions for use / Beachten Sie die Gebrauchsanweisung
Σ	Sufficient for 96 tests / ausreichend für 96 Tests
H2O	Deionized or distilled water / destilliertes oder deionisiertes Wasser
MP	Microplate / Microtiterplatte
CONJ	Conjugate E / Konjugat E
CAL	Calibrators / Kalibratoren
CONTROL	Control / Kontrolle
SUBS	TMB Solution / TMB Solution
STOP	Blocking Reagent / Stop Solution
DIL	Sample diluent / Proben diluent
OD	Optical density / Optische Dichte
WASH 20X	Washing Solution, 20X Concentrated / konzentrierte Waschlösung, 20X
TRIAL5000X	Trial,5000X concentrated

Dia Lab Services srl

Legal site: **via del Babuino n.51, 00187 Rome (RM) – ITALY**

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

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

e-mail: info@dialabservices.com