



AllergenA Total IgE



96

RA1002



Reagenti / Reagents / Reagenzien	Quantita/ Quantity/ Menge	
MP	1 x 96	Pronta per l'uso / Ready for use / Gebrauchsfertig
0-5 CAL	8 x 0.5 mL	Pronti per l'uso/ Ready for use / Gebrauchsfertig
CONJ	1 x 18 mL	Pronto per l'uso/ Ready for use / Gebrauchsfertig
CONTROL	2 x 0.5 mL	Pronti per l'uso Ready for use / Gebrauchsfertig
DIL	1 x 3 mL	Pronto per l'uso/ Ready for use / Gebrauchsfertig
SUBS	1 x 14 mL	Pronto per l'uso/ Ready for use / Gebrauchsfertig
WASH 20X	1 x 50 mL	Concentrata 20X / 20X Concentrated / 20x konzentriert
STOP	1 x 14 mL	Pronto per l'uso/ Ready for use / Gebrauchsfertig

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

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

1. APPLICAZIONI CLINICHE

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

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

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

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit **AllergenA Total IgE** è basato sul metodo del dosaggio immunoenzimometrico a "sandwich" su fase solida, attraverso due anticorpi monoclonali specifici per epitopi diversi sulla molecola di IgE. Uno di questi anticorpi è coniugato con perossidasi di rafano (HRP), l'altro è adsorbito sulla superficie interna dei micropozzetti. Le molecole di IgE presenti nel campione di siero si legano sia all'anticorpo immobilizzato nei micropozzetti, sia a quello coniugato con perossidasi (Fig. 1). Successivamente i pozzetti vengono lavati con la soluzione di lavaggio per rimuovere il materiale non legato dalla loro superficie interna. La quantità di coniugato legato è direttamente proporzionale al livello di IgE contenuto nel campione. Durante l'incubazione con la soluzione TMB si sviluppa una reazione colorimetrica. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di IgE nei campioni e nei calibratori. La concentrazione di IgE nel campione del paziente è calcolata tramite una curva standard che viene testata ed elaborata per ciascun dosaggio.

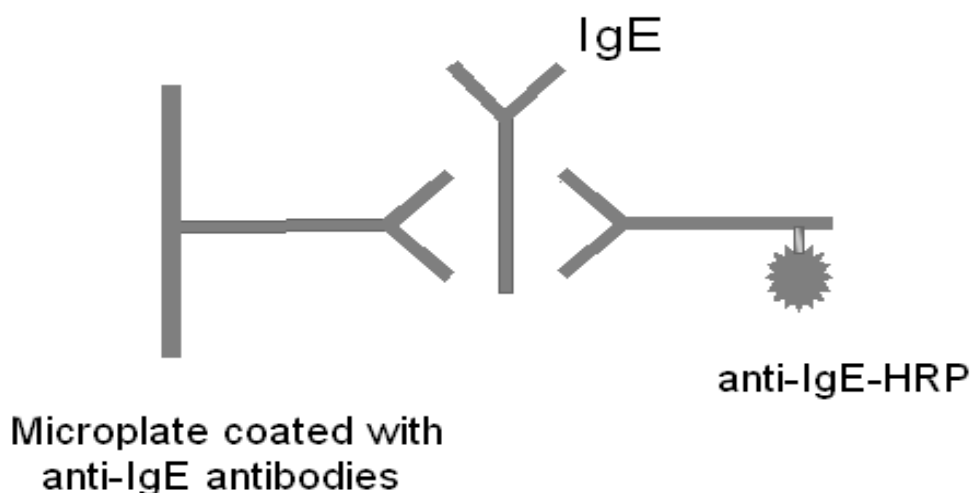


Fig. 1. Schema di reazione

3. CONTENUTO DEL KIT

MP	Micropiastra: 1 micropiastra da 12 strips, ciascuna composta da 8 pozzetti separabili (totale 96 pozzetti) rivestiti con anticorpi monoclonali anti-IgE.
CONJ	Coniugato: 1 flacone da 18 mL di soluzione contenente anticorpi monoclonali anti-IgE coniugati con HRP. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
0-5 CAL	Calibratori IgE: 8 flaconi da 0.5 mL ciascuno, contenenti una soluzione a base proteica con concentrazioni note di IgE: 0 - 10 - 50 - 100 - 250 - 500 UI/mL . Per le esatte concentrazioni di IgE vedere le etichette dei flaconi. Il set è composto da flaconi di CAL 1 , 2 di CAL 4 ed 1 flacone rispettivamente di: CAL 0 , CAL 2 , CAL 3 e CAL 5 . Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
CONTROL	Controllo IgE: 2 flaconi da 0.5 mL ciascuno, contenenti una soluzione a base proteica con una concentrazione nota di IgE. Per il range esatto di concentrazione, vedere l'etichetta del flacone. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
DIL	Diluyente Campioni: 1 flacone da 3 mL di soluzione a base di proteine. Conservante: Kathon 0.015%. Pronto per l'uso.
WASH 20X	Soluzione Lavaggio: 1 flacone da 50 mL di tensioattivo in soluzione salina tamponata, sufficiente per preparare 1000 mL di soluzione. Concentrata 20X .
STOP	Reagente Bloccante: 1 flacone da 14 mL di soluzione 1N HCl. Pronto per l'uso.
SUB	Soluzione TMB: 1 flacone da 14 mL di soluzione 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina in tampone citrato contenente perossido di idrogeno. Pronto per l'uso.

Note: i flaconi extra di **CAL** 1, 4 e **CONTROL** ricalibrazione sulla curva di calibrazione di riferimento. Per informazioni dettagliate vedere le istruzioni per l'uso dell'analizzatore automatico.

3.1 Preparazione dei reagenti

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C), 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 debitamente.

CAL **CONTROL** Calibratori e Controllo

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

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, evitare la formazione di schiuma.

SUBS Proteggere la **Soluzione TMB** dalla luce diretta.

3.2 Preparazione dei campioni

Lasciare che i campioni raggiungano la temperatura ambiente (18-25°C). Mescolare delicatamente i campioni al fine di garantirne l'omogeneità. Se è prevista una concentrazione di IgE nel siero in esame più alta rispetto a quella del Calibratore 5, il campione deve essere diluito **20 volte** con il **DIL** **Diluente Campioni**, in accordo con le istruzioni per l'uso.

Un esempio di diluizione manuale del campione è riportato di seguito:

190 µL di **DIL** **Diluente Campioni** + **10 µL** di campione di siero, vorticare o mescolare accuratamente.

4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEL KIT

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

Il kit **AllergenA Total IgE** deve essere conservato a 2-8 °C al momento del ricevimento, preferibilmente nella confezione del kit originale, fino alla data di scadenza. Una conservazione a T.A. di 25 °C è consentita, ma per non più di 5 giorni.

Il periodo di validità del kit è fino alla data di scadenza.

Dopo l'apertura iniziale il kit è stabile fino alla data di scadenza se si conserva a 2-8 °C. Se utilizzato in diversi test separati, il contenuto del kit deve essere conservato nel modo seguente:

- strips non utilizzate: in un sacchetto ben chiuso con cerniera richiudibile a 2-8 °C fino alla data di scadenza;
- flaconi con **Calibratori, Controllo, Coniugato, Soluzione Lavaggio** concentrato ed il **Reagente Bloccante**: a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
- flacone con la **Soluzione TMB**: a 2-8 °C fino alla data di scadenza, al riparo dalla luce;
- **Soluzione Lavaggio** preparata per essere utilizzata: a temperatura ambiente (18-25 °C) per non più di 5 giorni, in un flacone ben chiuso.

5. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- pipette di precisione variabili e calibrate ad 1 canale, con puntali monouso;
- pipetta di precisione variabile calibrata ad 8 canali, con puntali monouso;
- incubatore/agitatore per micropiastre (37 °C con velocità di agitazione compresa tra 400-800 rpm);
- attrezzatura manuale o automatica per il lavaggio dei pozzetti;
- lettore di micropiastre calibrato a 450 nm;
- miscelatore vortex per provette;
- beaker e cilindro graduati di volume adeguato;
- acqua distillata o deionizzata;
- guanti di plastica o lattice;
- vaschette di contenimento per dispensare i reagenti con la pipetta ad 8 canali;
- disinfettante;
- materiale assorbente (per il lavaggio manuale).

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per ottenere risultati riproducibili è 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 indicate 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.
- Non è consentita la ricalibrazione utilizzando una curva di calibrazione ottenuta con un kit di un altro lotto.
- La **Soluzione TMB** deve essere incolore. Una 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 è necessario osservare le seguenti norme di sicurezza:

- Utilizzare dispositivi di protezione individuale (es.: guanti monouso, camice, ecc.) durante la manipolazione di materiale potenzialmente infetto e durante il dosaggio.
- Non pipettare i reagenti con la bocca.
- Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Le soluzioni di TMB e Reagente Bloccante (HCl 1 N) vanno manipolate con cautela, così come i reattivi contenenti Kathon (Coniugato, Calibratori, Controllo e Diluente Campioni). Evitare il contatto con lappelle, gli occhi e le mucose. In caso di incidente lavare abbondantemente con acqua.
- I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione del presente kit sono stati testati per la presenza di HBsAg, anti-HIV e anti-HCV e sono risultati ripetutamente negativi. Comunque, 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 E** **DIL** **CAL** **CONTROL**), 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.

Non utilizzare plasma, siero emolizzato (rosso intenso) o lipemico (lattiginoso), né campioni di siero contenenti sodio azide come conservante. Conservare i campioni di siero a 2-8 °C per non più di 2 giorni. Aliquotare e congelare per prolungati periodi di conservazione (-20 °C e inferiore). Evitare il congelamento ripetuto.

8. PROCEDURA DEL TEST

La procedura manuale è descritta nel paragrafo 8.2

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

8.1 Procedura per il test automatico

Si garantisce l'applicabilità su strumentazione RADIM e/o SEAC, 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. 40)

A. Dispensare: **150 µL** di **Coniugato** **CONJ** in ogni pozzetto **ad eccezione dei pozzetti A1-A2 (bianco).**

B. Dispensare: **20 µL** di **Calibratori** **CAL**, **Controllo** **CONTROL** e campioni dei pazienti in duplicato nei rispettivi pozzetti.

Lasciare i pozzetti A1-A2 vuoti per il bianco.

C Incubare le strips per **90 minuti a 37°C in agitazione (500-800 rpm).**

D. Lavare **5 volte**, come descritto nella sezione 8.3.

E. Dispensare **100 µL** di **Soluzione TMB** **SUBS** in ogni pozzetto (incluso il bianco); incubare le strips **a temperatura ambiente (18-25°C) al buio per 15-30 minuti**, in base all'intensità di sviluppo del colore, o **10 minuti in agitazione (500-800 rpm) a 37°C.**

F. Dispensare **100 µL** di **Reagente Bloccante STOP** in ogni pozzetto (incluso il bianco) con la medesima sequenza e velocità usati per la dispensazione della **Soluzione TMB**. Agitare per **1-2 minuti a temperatura ambiente (18-25°C)**.

G. Leggere le DO a **450 nm entro 20 minuti**.

8.3 Procedura di lavaggio

È consigliabile l'utilizzo di un lavatore automatico per micropiastre regolato a **5 cicli di lavaggio** con un volume di **300 µL** di **Soluzione di Lavaggio** per pozzetto e per ciclo.

Se il lavatore automatico non è disponibile, la procedura di lavaggio può essere effettuata manualmente:

- rimuovere il contenuto dei pozzetti e trasferirlo in un contenitore con disinfettante;
- dispensare **300 µL** di soluzione di lavaggio (preparata in accordo alla sezione 3.1) in ogni pozzetto, agitare la micropiastra delicatamente per **5-10 secondi** e rimuovere il contenuto dei pozzetti; ripetere l'operazione per **5 volte**; battere i pozzetti vigorosamente su materiale assorbente per rimuovere ogni residuo di liquido.

9. ELABORAZIONE DEI DATI

Se il lettore non può essere regolato sullo zero utilizzando il bianco (substrato) dei pozzetti A1-A2, sottrarre il valore medio delle DO dei pozzetti A1-A2 dai valori di tutte le altre DO prima di effettuare i calcoli.

Esempio:

DO (Cal 5) misurata = 2.28 e DO (bianco) = 0.06;

DO (Cal 5) calcolata = $2.28 - 0.06 = 2.22$

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

I dati devono soddisfare i seguenti criteri:

- media delle DO del bianco (nei pozzetti A1-A2) < 0.100 ;
- media delle DO del Cal 5 > 1.0 (dopo sottrazione del bianco).
- le concentrazioni del controllo devono rientrare nel range di accettabilità indicato sull'etichetta del flacone.

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

9.2 Determinazione Quantitativa

Si raccomanda l'utilizzo di un software specializzato per la determinazione quantitativa. Le medie delle DO dei calibratori sono graficate verso le loro rispettive

concentrazioni di IgE utilizzando un fitting di elaborazione 4PL o 5PL (vedere un tipico esempio di curva standard in fig.2). Le concentrazioni di IgE nei campioni vengono calcolate utilizzando la curva standard. Non è consentita alcuna estrapolazione della curva standard per concentrazioni di IgE superiori al valore nominale del calibratore 5 (approssimativamente 500 UI/mL). In questo caso il campione dovrebbe essere diluito 20 volte con il **Diluyente Campioni** e ritestato. Moltiplicare la concentrazione misurata dei campioni prediluiti per il fattore di diluizione (20). Se la concentrazione del campione diluito 20 volte rimane sopra la concentrazione del **CAL 5**, assegnare una concentrazione "sopra 10000 UI/mL" al campione.

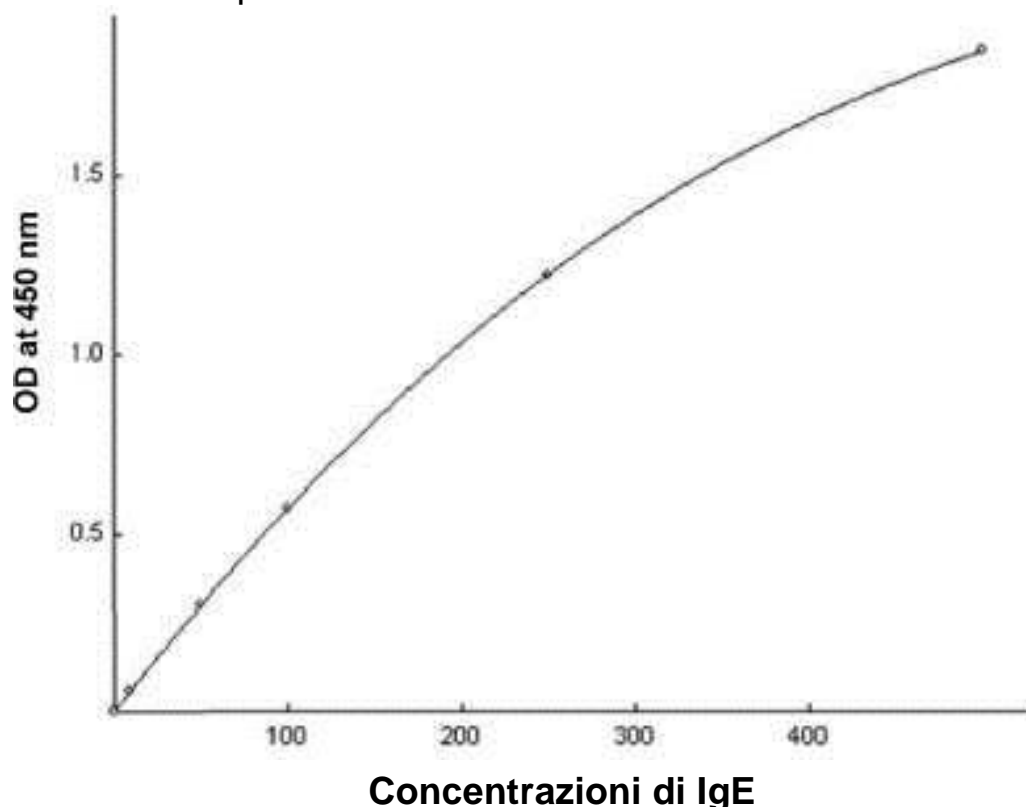


Fig. 2. Esempio di una tipica curva standard.

Non utilizzare per la valutazione dei dati del test reale.

10. VALORI ATTESI

Campioni di siero raccolti la mattina, tra le ore 9:00 e le 11:00 da 79 persone apparentemente sane (sia maschi che femmine) dell'età di 21-45 anni e da 226 pazienti con patologie allergiche (della stessa età), sono stati testati con il kit **AllergenA Total IgE**. Tra gli individui sani nel 48% dei casi la concentrazione di IgE è risultata inferiore a 25 UI/mL, nel 34% dei casi tra 25-100 UI/mL e solo nel 18% dei casi superiore a 100 UI/mL. Tra i pazienti allergici la concentrazione di IgE inferiore a 25 UI/mL è stata rilevata nell' 8% dei casi, tra 25-100 UI/mL nel 22% dei casi ed oltre 100 UI/mL nel 70% dei casi. Tali limiti devono essere considerati puramente indicativi.

Si raccomanda fortemente ogni laboratorio di determinare il proprio intervallo di riferimento per le concentrazioni di IgE.

11. CONTROLLO QUALITA'

L'uso di campioni di controllo è consigliato per assicurare la validità continua dei risultati.

12. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE DEL TEST

12.1 Calibrazione - Tracciabilità

Il kit **AllergenA Total IgE** è stato calibrato verso il WHO 2° Standard Internazionale 75/502.

12.2 Specificità

Nessuna cross-reattività è stata rilevata tra gli anticorpi monoclonali anti-IgE usati nel test e le IgG, IgM e IgA.

12.3 Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica del kit **AllergenA Total IgE**, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dal calibratore zero, è pari a 2.3 UI/mL. Tale concentrazione è stata definita come la media delle DO di 10 replicati del Calibratore 0 più due deviazioni standard.

12.4 Range di Misurazione

Il kit **AllergenA Total IgE** è stato validato per la misurazione di IgE all'interno della fascia di concentrazioni (senza diluizioni) di 2.3-500 UI/mL.

12.5 Unità di Misura

Nel kit **AllergenA Total IgE** le concentrazioni dei calibratori sono espresse in UI/mL. Per convertirle in ng/mL, moltiplicare la concentrazione in UI/mL per 2,4

12.6 Effetto Gancio

Per il kit **AllergenA Total IgE** non è stato rilevato alcun effetto gancio alle alte dosi per una concentrazione di IgE fino a 10000 UI/mL. L'effetto gancio a dosi elevate è stato determinato utilizzando come matrice il Calibratore 0 con l'antigene.

12.7 Variazione intra- e inter-saggio (Precisione)

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

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL	Intra-saggio	
		DS	CV, %
HS 1	14.1	1.01	7.2
HS 2	38.5	1.64	4.3
HS 3	81.4	4.35	5.4
HS 4	88.0	5.54	6.3
HS 5	103	4.7	4.5
HS 6	195	5.8	3.0
HS 7	262	18.1	6.9
HS 8	434	22.9	5.3

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

Campione	Concentrazione media di IgE, UI/mL			Inter-saggio	
	Test 1	Test 2	Test 3	DS	CV, %
HS 1	14.1	15.0	14.6	0.45	3.1
HS 2	38.5	37.5	41.2	1.91	4.9
HS 3	81.4	82.1	82.7	0.65	0.8
HS 4	88.0	84.6	89.4	2.47	2.8
HS 5	103	99	106	3.8	3.7
HS 6	195	185	208	11.4	5.8
HS 7	262	239	272	17.0	6.6
HS 8	434	398	423	18.6	4.4

13. LIMITAZIONE DEL METODO

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

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

14. LEGENDA SIMBOLI: vedere pagina 39

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

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY FOR PROFESSIONAL USE ONLY

1. CLINICAL APPLICATIONS

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

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

2. PRINCIPLE OF TEST

AllergenA Total IgE 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 read from a standard curve that is processed in each assay.

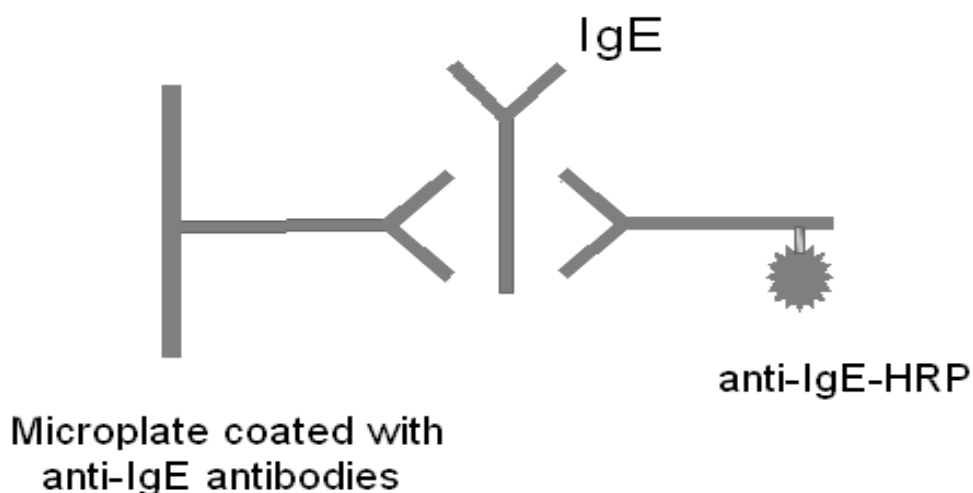


Fig. 1. Reaction scheme

3. CONTENT OF THE KIT

MP	Microplate: 1 microplate with 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-IgE monoclonal antibodies.
CONJ	Conjugate: 1 vial with 18 mL of solution containing anti-IgE monoclonal antibodies conjugated with HRP. Ready to use
0-5 CAL	IgE Calibrators: 8 vials with 0.5 mL each of protein-based solution containing known IgE concentrations: 0 - 10 - 50 - 100 - 250 - 500 IU/mL . For exact IgE concentrations see vial labels. The set consists of 2 vials of CAL 1 , 2 of CAL 4 and 1 vial respectively: CAL 0 , CAL 2 , CAL 3 and CAL 5 . Ready to use.
CONTROL	IgE Control: 2 vials with 0.5 mL of protein-based solution containing known IgE concentration. For exact range of IgE concentration, see vial labels. Ready to use.
DIL	Sample Diluent: 1 vial with 3 mL of protein-based solution. Ready to use.
WASH 20X	Washing Solution: 1 vial with 50 mL of surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution. 20X concentrated
STOP	Blocking Reagent: 1 vial with 14 mL of 1 N HCl solution. Ready to use.
SUB	TMB Solution: 1 vial with 14 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide. Ready to use.

Note: Extra vials of **CAL 1**, **4** and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for automatic analyser.

3.1 Reagent Preparation

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

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 duly.

CAL **CONTROL** **Calibrators and Control**

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure than no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

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

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

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUBS Protect **TMB Solution** from direct light.

3.2 Sample Preparation

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

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

190 µL of **DIL** **Sample Diluent** + **10 µL** of serum sample,
vortex or mix thoroughly.

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

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

AllergenA Total IgE 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 5 days.

Shelf life of the kit is 12 months.

After initial opening the kit is stable for 1 month 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, Conjugate, concentrated Washing Solution and Blocking Reagent: at +2...+8 °C until the expiration date;
- vial with TMB Solution: at +2...+8 °C for until the expiration date, protected from light;
- Washing Solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

5. 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;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- 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 analyzer immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator.
- Recalibration using calibration curve, obtained with kit of any other lot, is not allowed.
- TMB Solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
- Utilize a suitable method for the correct identification of patient samples. Incorrect identification may cause a specificity losses of the system and wrong clinical results.

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

- Use protective individual devices (ex.: disposable gloves, lab coats, etc.) while handling potentially infectious material as well as during the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- TMB Solution and Blocking Reagent (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 E** **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.

7. 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 2 days. Aliquot and freeze samples for longer storage (-20 °C and lower). Avoid repeated freezing.

8. TEST PROCEDURE

The manual procedure must be performed as described in paragraph 8.2. For internal quality control, it is advisable to use Control Serum at known concentration that allow assay performances to be monitored.

8.1 Assay Procedure for Automatic Test

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

While using another 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 analyzer 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 40)

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 patient's samples in duplicates into the respective wells.

Leave wells A1-A2 empty for blank.

C Incubate strips for **90 minutes at +37 °C while shaking (500-800 rpm)**.

D. Wash **5 times**, as described in section 8.3.

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 (500-800 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 within 20 min**.

8.3 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at **5 wash cycles** and a volume of **300 µL** of **wash solution** per well per cycle. If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense **300 uL** of wash solution (prepared according to section 3.1) into each well, shake the plate carefully for **5-10 sec** and remove the contents of the wells; repeat **5 times**;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

9. 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 = $2.28 - 0.06 = 2.22$

9.1 Data Reliability (for OD Measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) <0.100;
- average OD of Cal 5 >1.0 (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.

9.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective IgE concentrations using 4PL or 5PL fit (see typical standard curve, fig. 2). Calculate concentration of IgE in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to IgE concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 500 IU/mL) is forbidden. In this case the sample should be diluted 20-fold with **Sample Diluent** and re-tested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by dilution factor (20-fold).

If concentration of the sample diluted 20-fold remains above concentration of the **CAL** 1-5 to assign concentration "above 10000 IU/mL" to a sample.

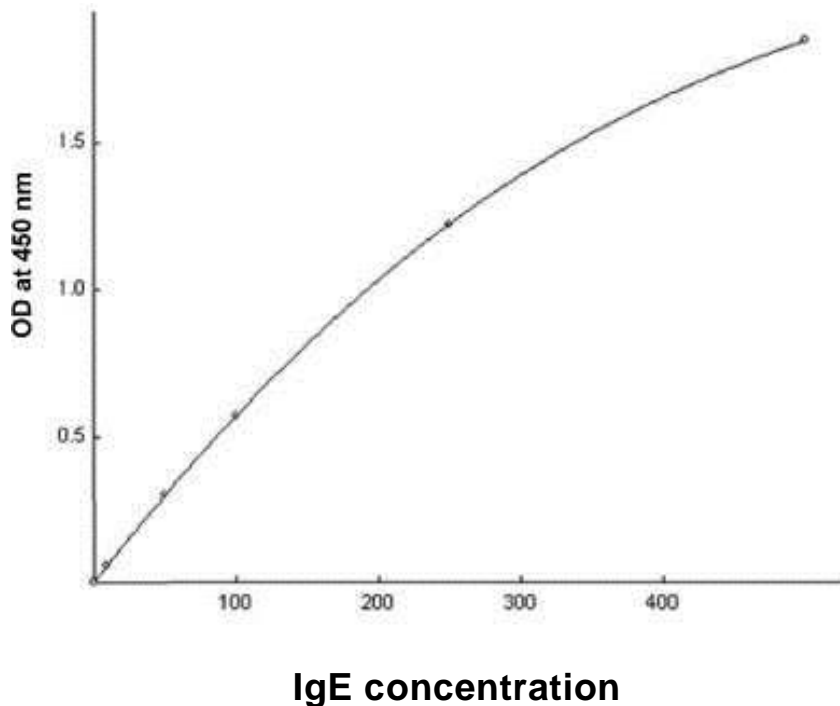


Fig. 2. Example of typical standard curve.

Do not use for evaluation of real assay data.

10. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 79 apparently healthy people (both males and females) between the ages of 21 -45 and 226 patients with allergic diseases (of the same age), were assayed with **AllergenA Total IgE** kit. Among healthy individuals in 48% cases IgE concentration was below 25 IU/mL; in 34% cases between 25-100 IU/mL, and only in 18% cases above 100 IU/mL. Among allergic patients IgE concentration below 25 IU/mL was detected in 8% cases; between 25-100 IU/mL in 22% cases and above 100 IU/mL in 70% cases. These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of IgE concentrations.

11. QUALITY CONTROL

The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

12.1 Calibration-Traceability

AllergenA Total IgE kit was calibrated against the WHO 2nd International Reference Preparation 75/502.

12.2 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.

12.3 Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of **AllergenA Total IgE** kit, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 2.3 IU/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of Calibrator 0 plus 2 SD.

12.4 Measurement Range

AllergenA Total IgE kit was validated for measurement of IgE concentration within the concentration range (without dilution) of 2.3 - 500 IU/mL.

12.5 Measurement Units

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

12.6 Hook Effect

For **AllergenA Total IgE** 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.

12.7 Intra- and Inter-Assay Variation (Precision)

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

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
HS 1	14.1	1.01	7.2
HS 2	38.5	1.64	4.3
HS 3	81.4	4.35	5.4
HS 4	88.0	5.54	6.3
HS 5	103	4.7	4.5
HS 6	195	5.8	3.0
HS 7	262	18.1	6.9
HS 8	434	22.9	5.3

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

Sample	Mean IgE concentration, IU/mL			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
HS 1	14.1	15.0	14.6	0.45	3.1
HS 2	38.5	37.5	41.2	1.91	4.9
HS 3	81.4	82.1	82.7	0.65	0.8
HS 4	88.0	84.6	89.4	2.47	2.8
HS 5	103	99	106	3.8	3.7
HS 6	195	185	208	11.4	5.8
HS 7	262	239	272	17.0	6.6
HS 8	434	398	423	18.6	4.4

13. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings. Due to the heterogeneous nature of human antibodies there might be samples that do not maintain dilution parallelism.

14. SYMBOLS LEGEND: see page 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-Helminthische 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 **AllergenA Total IgE** 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.

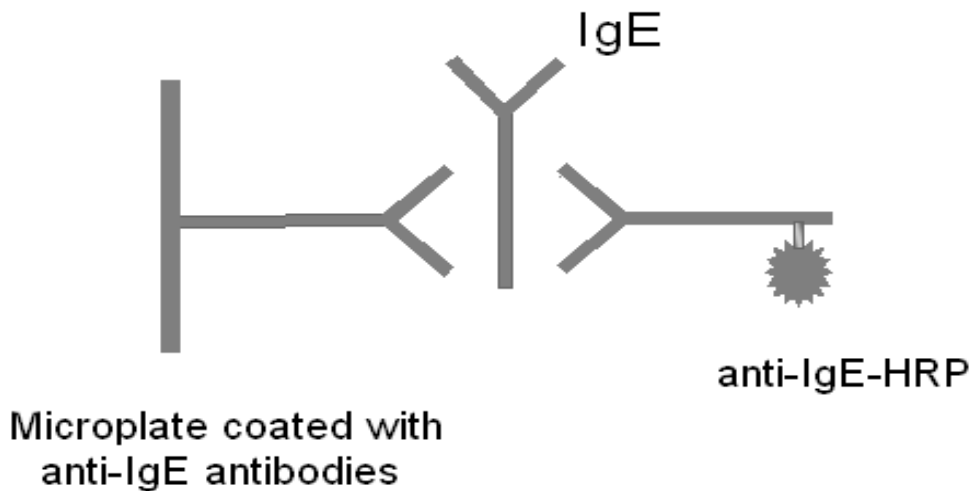


Abb. 1. Reaktionsschema

3. INHALT DES KITS

MP	Microplate: 1 Mikrotiterplatte mit 12 brechbaren 8-Well-Streifen (insgesamt 96 Wells), beschichtet mit monoklonalen Anti-IgE-Antikörpern.
CONJ	Conjugate: ein Fläschchen mit 18 ml. Die Lösung enthält monoklonale Anti-IgE-Antikörper, konjugiert mit HRP. Gebrauchsfertig.
0-5 CAL	IgE Calibrators: 8 Fläschchen mit jeweils 0,5 ml einer Lösung auf Proteinbasis mit IgE in bekannten Konzentrationen: 0 - 10 - 50 - 100 – 250- 500 IU/ml . Die exakten IgE-Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Das Set besteht aus 2 Fläschchen von CAL 1,2 und CAL 4 bzw. 1 Fläschchen CAL 0, CAL 2, CAL 3 und CAL 5 . Gebrauchsfertig.
CONTROL	IgE Control: 2 Fläschchen mit 0,5 ml Lösung auf Proteinbasis mit bekannter IgE-Konzentration. Die genauen Bereiche der IgE-Konzentration entnehmen Sie bitte dem Label des Fläschchens. Gebrauchsfertig.
DIL	Sample Diluent: 1 Fläschchen mit 3 ml einer Lösung auf Proteinbasis. Gebrauchsfertig.
WASH 20X	Washing Solution Kit E.W.: 1 Fläschchen mit 50 ml; Tensid in gepufferter Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Waschlösung. 20fach konzentriert.
STOP	Stop Solution: 1 Fläschchen mit 14 ml 1N HCL-Lösung. Gebrauchsfertig.

SUBS	TMB Solution AK: 1 Fläschchen mit 14 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Lösung in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid. Gebrauchsfertig.
-------------	---

Hinweis: Zusätzliche Fläschchen von CAL 1, 4 und CONTROL werden für die Neukalibrierung auf Referenzkalibrierungskurve zur Verfügung gestellt. *Ausführliche Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung für den automatischen Analyser.*

3.1 Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

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

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrollen

Flüssige Kalibratoren und Kontrollen sind gebrauchsfertig. Bereiten Sie lyophilisierte Kalibratoren wie folgt vor: Tippen Sie vorsichtig auf die Fläschchenkappen, um die gesamte Trockenmasse abzustößen. Öffnen Sie die Fläschchen und legen Sie die Kappen vorsichtig auf die saubere trockene Oberfläche. 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser in jedes Fläschchen mit lyophilisierten Kalibratoren geben, Fläschchen mit den entsprechenden Kappen schließen und 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen. Dann vorsichtig schütteln bis die Trockenmasse vollständig gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur sanft schütteln. Achten Sie darauf, dass keine Trockenmasse auf den Kappen und Wänden der Fläschchen verbleibt.

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.

3.2 Probenvorbereitung

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

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

190 µL DIL Sample Diluent + 10 µL Serumprobe,

Gründlich vortexen oder mischen.

4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT DES KITS

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

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

Eine Lagerung bei bis zu 25°C ist für maximal 5 Tage möglich.

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 12 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, Control, Conjugate, konzentrierter Wash Solution, Blocking Reagent: bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit TMB Solution: bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum, das Substrate vor direktem Licht schützen;
- 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;

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES ZUBEHÖR UND MATERIALIEN

- Ein Set kalibrierte, variable Präzisionspipetten mit Einwegspitzen;
- Kalibrierte, variable 8-Kanal-Präzisionspipette mit Einwegspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (37°C, Schüttelgeschwindigkeit 400 bis 800 Rpm);
- Zubehör für manuelles oder automatisiertes Spülen der Wells;
- Kalibrierter Mikrotiterplatten-Reader (450 nm);
- messbecher oder -zylinder für die entsprechenden Volumina;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Einmalhandschuhe aus Latex oder Plastik;
- Trays für das Pipettieren von Reagenzien mit einer 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Saugfähiges Material (für manuelles Waschen).

6. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Für fehlerfreie und reproduzierbare Ergebnisse müssen folgende Regeln eingehalten werden:

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

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

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

- Verwenden Sie Schutzkleidung (z.B. Einweghandschuhe, Laborkittel etc.) beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und während der Testdurchführung.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund.
- Während der Testdurchführung nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika anwenden.
- TMB-Lösung und Blocking Reagent (HCL 1N) sollten mit Vorsicht behandelt werden, genau wie Reagenzien mit Kathon (Conjugate E1, Conjugate E2, IgE Calibrators, Sample Diluent, Assay Buffer). Vermeiden Sie Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhaut. Bei versehentlichem Kontakt gründlich unter fließendem Wasser abspülen.
- Alle Materialien humanen Ursprungs, die für die Herstellung dieses Kits verwendet wurden, wurden negativ auf HBsAg, Anti-HIV und Anti-HCV getestet. Da zurzeit kein Test die völlige Freiheit von diesen Viren garantieren kann, müssen alle Proben und Reagenzien, die biologisches Material enthalten, als potentiell infektiös betrachtet werden. Deshalb muss der Assay-Abfall in Übereinstimmung mit den vorgegebenen lokalen 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 E** **DIL** **CAL** **CONTROL**), deshalb sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

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

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. Nicht wiederholt einfrieren.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

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 Testansetzen verwendet wird, ist es nötig, die Reagenzien sofort nach dem Pipettieren aus dem Gerät zu nehmen, weil Flüssigkeit aus den Fläschchen verdunsten kann. Stellen Sie die Reagenzien in den Kühlschrank.

8.2 Manuelle Testdurchführung (siehe auch Assayschema, Seite 40)

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.

C 90 Minuten bei +37 °C und unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.

D. Dekantieren und jedes Well 5-mal waschen, wie in Abschnitt 8.3 beschrieben.

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 (500-800 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 innerhalb von 20 min. messe.

8.3 Wasch-Prozedur

Es ist ratsam die Mikrotiterplatte mit 5 **Waschzyklen** und einem Volumen von **300 µl Waschlösung** pro Well und Zyklus zu waschen. Wenn kein Washer verfügbar ist, kann der Waschvorgang manuell durchgeführt werden:

1. den Inhalt der Wells in einen Behälter mit Desinfektionsmittel entfernen;
2. **300 uL** Waschlösung (nach Abschnitt 3.1) in jedes Well geben, die Platte 5-10 **Sek.** vorsichtig schütteln und den Inhalt der Wells entfernen; 5 Mal wiederholen;
3. die Platte vorsichtig auf saugfähigem Material ausschlagen, um Flüssigkeitsrückstände zu entfernen.

9. Datenverarbeitung

Wenn der Reader nicht mit dem Substrat-Blank 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

9.1 Datenzuverlässigkeit (ODs gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten die folgenden Kriterien erfüllen:

1. durchschnittliche leere OD (in Well A1-A2) <0.100 ;
2. durchschnittliche OD von Cal 5 >1.0 (nach leerer Subtraktion).
3. 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.

9.2 Quantitative Bestimmung

Spezielle Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Mittelwert-OD von Kalibratoren werden im Vergleich zu ihren jeweiligen IgE-Konzentrationen mit 4PL- oder 5PL-Passung dargestellt (siehe typische Standardkurve, Abb. 2). Berechnen Sie die Konzentration von IgE in Proben mit Standardkurve.

Jede Extrapolation der Standardkurve auf die IgE-Konzentration oberhalb des Nennwertes des Kalibrators 5 (ca. 500 I.E./ml) 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 10000 I.E./ml" zuzuweisen.

TYPISCHE STANDARDKURVE (BEISPIEL)

Nicht anstelle der tatsächlich ermittelten Daten verwenden.

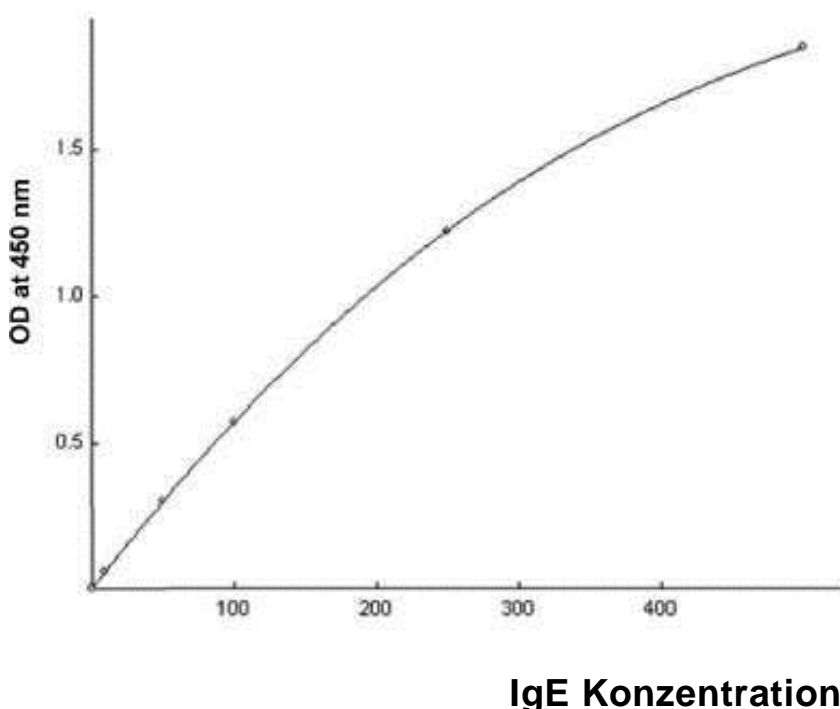


Abb. 2. Typisches Beispiel einer Standardkurve

10. ERWARTETE WERTE

Serumproben, die zwischen 9 und 11 Uhr von 79 scheinbar gesunden Menschen (sowohl Männer als auch Frauen) im Alter von 21 -45 Jahren und 226 Patienten mit allergischen Erkrankungen (im gleichen Alter) entnommen wurden, wurden mit **AllergenA Total IgE Kit untersucht**. Bei gesunden Personen lag die IgE-Konzentration in 48% der Fälle unter 25 I.E./ml; in 34% Fällen zwischen 25-100 I.E./ml und nur in 18% Fällen über 100 I.E./ml. Bei Allergikern wurde in 8% der Fälle eine IgE-Konzentration unter 25 I.E./ml festgestellt; zwischen 25-100 I.E./ml in 22% Fällen und über 100 I.E./ml in 70% Fällen. Diese Grenzwerte sollten nur als Leitlinien betrachtet werden.

Es wird jedem Labor dringend empfohlen, seinen eigenen Referenzbereich der IgE-Konzentrationen zu bestimmen.

11. QUALITÄTSKONTROLLE

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

12. TESTCHARAKTERISTIKA

12.1 Kalibrierung-Traceability

AllergenA Total IgE wurde gegen den 2. WHO Internationalen Standard Immunglobulin E (IgE), Referenz Preparatio 75/502 kalibriert.

12.2 Spezifität

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

12.3 Analytische Sensitivität (untere Nachweisgrenze)

Die analytische Sensitivität des **AllergenA Total IgE**, d.h. die niedrigste nachweisbare Konzentration, die bei Patientenproben unterschieden werden kann, liegt bei 2,3 IU/ml. Sie ist definiert als der Mittelwert von 10 Replikaten des Calibrator 0 plus 2 SD.

12.4 Messbereich

AllergenA Total IgE Kit wurde für die Messung der IgE-Konzentration im Konzentrationsbereich (ohne Verdünnung) von 2,3 - 500 I.E./ml validiert.

12.5 Maßeinheiten

In **Allergena Total IgE** 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.

12.6 Hook-Effekt

Für das **Allergena Total IgE** 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.

12.7. 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	14,1	1,01	7,2
2	38,5	1,64	4,3
3	81,4	4,35	5,4
4	88,0	5,54	6,3
5	103	4,7	4,5
6	195	5,8	3,0
7	262	18,1	6,9
8	434	22,9	5,3

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	14,1	15,0	14,6	0,45	3,1%
2	38,5	37,5	41,2	1,91	4,9%
3	81,4	82,1	82,7	0,65	0,8%
4	88,0	84,6	89,4	2,47	2,8%
5	103	99	106	3,80	3,7%
6	195	185	208	11,4	5,8%
7	262	239	272	17,0	6,6%
8	434	398	423	18,6	4,4%

13. GRENZEN DES VERFAHRENS








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

14. SYMBOLLEGENDE: Seite 39.

SCHEMA DEL DOSAGGIO/ASSAY SCHEME / ASSAYSCHHEMA

Pozzetti /Wells/ Wells	Bianco/ Blank/ Blank	CAL CONTROL	Campioni/ Samples/ Proben
Reagenti/ Reagents/ Reagenzien			
CONJ	–	150 µL	150 µL
CAL CONTROL	–	20 µL	–
Campioni/ Samples/ Proben	–	–	20 µL
Agitazione e incubazione 1/ Shake and Incubation No.1/ Schütteln und Inkubation 1	90 min, +37°C, 500–800 rpm		
WASH 20X (diluita / diluted, verdünnt)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubazione 2/ Incubation No.2 / Inkubation 2	15-30 min, +18...+25°C al buio/in the dark oppure/or 10 min, +37°C, 500-800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Agitazione/Stirring / Mischen	1–2 min, +18...+25°C		
Misurazione DO / OD measuring / OD Messung	450 nm		
Calcoli / Calculations / Auswertung	Software corrispondente/ Corresponding software/ entsprechende Software		

LEGENDA SIMBOLI / SYMBOL LEGEND / SYMBOLLEGENDE

REF	Codice di riferimento o di ordine / reference or order code / Referenz-oder Bestellnummer
LOT	Lotto / lot / Charge
	Data di scadenza / expiration date / Verfallsdatum
IVD	Per uso diagnostico in-vitro / For in-vitro diagnostic use / Nur zur In-vitro-Diagnostik
CE	Marcatura 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
H2O	Acqua distillata o deionizzata / deionized or distilled water / destilliertes oder deionisiertes Wasser
RCNS	Ricostituire con il volume di liquido specificato / Reconstitute with specified volume of liquid / rekonstituieren mit
MP	Micropiastra / Microplate / Microtiterplatte
CONJ E	Coniugato E/ Conjugate E / Konjugat E
CAL	Calibratori / Calibrators / Kalibratoren
CONTROL	Controllo / Control / Kontrolle
SUBS	Soluzione TMB / TMB Solution / TMB Solution
STOP	Reagente Bloccante / Blocking Reagent / Stop Solution
DIL	Diluyente dei campioni / Sample diluent / Proben diluent
OD	Densità ottica / Optical density / Optische Dichte
WASH 20X	Soluzione Lavaggio, Concentrata 20X/ Washing Solution, 20X Concentrated / konzentrierte Waschlösung, 20X



Dia Lab Services srl

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

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

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

