

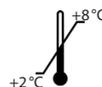
IgE ELISA

*Zur in-vitro-Bestimmung von IgE
in Serum und Stuhl*

*For the in vitro determination of IgE
in serum and stool*

Gültig ab / Valid from 2023-03-13

REF K 6511



IVD



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Stuhlprobenextraktion</i>	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Pipettierschema</i>	7
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	9
10. QUALITÄTSKONTROLLE	9
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	9
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	9
<i>Genauigkeit – Richtigkeit</i>	10
<i>Linearität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	11
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von IgE aus Serum und Stuhl geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

IgE Antikörper werden auch als Reagine bezeichnet. Die Verteilung im Körper entspricht derjenigen von IgA, der Katabolismus ist mit einer Halbwertszeit von 2.3 Tagen hoch. Die Serum-IgE-Konzentration repräsentiert nicht die effektive IgE-Menge des Organismus, da IgE bevorzugt regional im Respirationstrakt, dem Gastrointestinaltrakt und den Lymphknoten gebildet wird. Aufgrund seiner Affinität zu Mastzellen ist ein Teil an deren IgE-Rezeptoren gebunden.

IgE-Antikörper vermitteln die Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp. Durch harmlose polyvalente Antigene, wie z.B. Pollen oder Hausstaubmilbe werden B-Zellen der Schleimhäute an der Eintrittspforte mit CD4-Zellhilfe zur Bildung von spezifischem IgE angeregt. Dies bindet über Fc-Rezeptoren an Mastzellen, die nun sensibilisiert sind. Beim nächsten Kontakt des polyvalenten Antigens mit der sensibilisierten Mastzelle werden gebundene IgE-Antikörper kreuzvernetzt, die Zelle degranuliert und Mediatoren werden freigesetzt, welche die Symptomatik von Heuschnupfen, Asthma und atopischen Ekzem hervorrufen.

Indikationen

- Allergiediagnose bzw. Atopieprognose bei Säuglingen und Kleinkindern mit rezidivierender, spastischer Bronchitis, Pseudo-Krupp-Anfällen, usw.
- Differentialdiagnose des konstitutionellen Ekzems
- Differentialdiagnose von sog. unspezifischen Atemwegserkrankungen
- Differentialdiagnose der perennialen Rhinopathie bzw. Sinupathie
- Suche nach einer Sensibilisierung im Sinne einer erweiterten Allergiediagnostik bei „Allergie“-verdächtigen Krankheitsbildern unklarer Ursache, z.B. akute rezidivierende und chronische Urtikaria
- Krankheitszustände mit ungeklärter Eosinophilie oder Fieber
- Verdacht auf seltene Parasitosen, bei unklarer Bluteosinophilie und negativem Parasitennachweis.
- Immunmangelsyndrome

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 6511	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	2 x 100 ml
K 6511	CONJ	Konjugatkonzentrat (anti-IgE), peroxidase markiert	1 x 150 µl
K 6511	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0,62; 2,5; 10; 40 kU/l)	5 x 1 ml
K 6511	CTRL 1	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 6511	CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 1 ml
K 6511	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Stuhlprobenaufbereitungssystem wie z.B. Artikel-Nr. K 6998SAS
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge

- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)
 - * Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **Vorbereitung des Konjugats:** Das **Konjugatkonzentrat (CONJ)** wird vor Gebrauch **1:101** in **Waschpuffer** verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das CONJ ist bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. **Konjugat** (1:101 verdünntes CONJ) **ist nicht stabil und kann nicht aufbewahrt werden**.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Serum

Serumproben werden vor dem Einsatz im Test **1:50** verdünnt,

z. B. **20 µl** Probe + **980 µl** Probenverdünnungspuffer (SAMPLEBUF), gut mischen.

Pro Vertiefung werden **100 µl** der Verdünnung im Test eingesetzt.

Stuhlprobenextraktion

Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) wird als **Probenextraktionspuffer** verwendet. Wir empfehlen folgende Probenvorbereitung:

Stuhlprobenaufbereitungssystem (SAS) (Artikel-Nr. K 6998SAS)

Stuhlprobenröhrchen - Anwendung

Bitte beachten Sie, dass der Verdünnungsfaktor der Stuhlsuspension von der aufgenommenen Stuhlmenge und dem Puffervolumen abhängig ist:

SAS mit 0,75 ml Probenextraktionspuffer:

Aufgenommene Stuhlmenge: 15 mg

Puffervolumen: 0,75 ml

Verdünnungsfaktor: 1:50

Die Aufbereitung von Stuhlproben mit Hilfe des SAS wird wie folgt durchgeführt:

- a) Die Rohprobe muss aufgetaut sein, bei auffallend inhomogenen Proben empfiehlt sich eine mechanische Homogenisierung durch Spatel, Impföse o. Ä.
- b) Das **unbefüllte Stuhlprobenröhrchen** vor der Verwendung mit **0,75 ml Probenextraktionspuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) **befüllen**. **Wichtig:** Probenextraktionspuffer vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen!
- c) Röhrchen aufschrauben (gelbes Gewinde), der untere Teil des Stäbchens weist Einkerbungen auf, welche durch Einstechen in die Stuhlprobe vollkommen mit Probe bedeckt werden müssen. Anschließend das Stäbchen durch den Abstreifring zurück ins Röhrchen stecken (leichter Widerstand) und fest verschrauben.

- d) Das Röhrchen so lange vortexen bis keine Stuhlreste mehr in den Einkerbungen auszumachen sind. Für die Erhebung valider Messwerte ist darauf zu achten, dass die Stuhlsuspension nach dem Mischungsprozess eine möglichst homogene Konsistenz aufweist. Bei besonders festen Stühlen kann die Homogenität der Suspension durch längeres Einweichen (ca. 10 min) des Stuhls im Probenextraktionspuffer bedeutend gesteigert werden.
- e) Nach erfolgter Suspendierung der Probe wird das Röhrchen ca. 10 Minuten stehen gelassen. Aufschwimmende Schalen von Körnern u. Ä. können hierbei vernachlässigt werden.
- f) Anschließend wird der gesamte Kopf des Stuhlprobenröhrchens (blauer Ring) zusammen mit dem Stäbchen vorsichtig abgeschraubt und verworfen. Beim Abschrauben des Kopfes ist darauf zu achten, dass das abgesetzte Sediment nicht erneut aufgewirbelt wird.

Verdünnung I 1:50

100 µl der **Verdünnung I** werden im Test pro Vertiefung eingesetzt.

Probenlagerung

Die Verdünnung I ist bei -20 °C für ca. 1 Monat haltbar.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von IgE.

In diesem ELISA bindet das IgE aus den Patientenproben bzw. Standards an anti IgE-Antikörper, die auf der Oberfläche der Kavitäten der Mikrotiterplatte fixiert sind. Danach erfolgt die Zugabe des peroxidasemarkierten spezifischen Antikörpers. Nach nochmaligem Waschen und Substratzugabe erfolgt die Quantifizierung durch Umsetzung des Substrates. Die Farbentwicklung ist dabei zur Analytmenge (Probe bzw. Kontrolle) proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (15–30 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Die Vertiefungen vor Gebrauch 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
2.	100 µl Standards/Kontrollen/verdünnte Proben in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
3.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	100 µl Konjugat (verdünntes CONJ) in jede Vertiefung pipettieren.
6.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (15–30 °C) unter Schütteln* inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	5–10 min** bei Raumtemperatur (15–30 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen.

11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.
-----	--

* Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

** Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen, den Farbschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z.B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

Serum und Stuhlproben

Die ermittelten Ergebnisse werden mit dem **Verdünnungsfaktor 50** multipliziert, um die tatsächlichen Konzentrationen zu erhalten.

Sollte ein **anderer Verdünnungsfaktor** verwendet worden sein, so ist die ermittelte Konzentration mit dem verwendeten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, können stärker verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden. Bei der folgenden Auswertung ist der veränderte Verdünnungsfaktor zu beachten.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzwerte

IgE-Konzentration (Serum): < 100 kU/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 8

Die Wiederholbarkeit wurde mit 3 Serumproben unter **gleichbleibenden** Bedingungen (Bediener, Messgerät, Tag, Kitcharge identisch) bestimmt.

Probe	Mittelwert [kU/l]	VK [%]
1	306,96	2,3
2	123,11	6,5
3	154,10	8,0

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 36

Die Reproduzierbarkeit wurde mit 2 Kontrollproben unter **variablen** Bedingungen (Bediener, Messgeräte, Tage, Kitchargen unterschiedlich) bestimmt.

Probe	Mittelwert [kU/l]	VK [%]
1	1,37	13,7
2	6,50	5,0

Genauigkeit – Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Verhältnis zwischen dem Messergebnis und der wahren Konzentration einer Probe an. Hierzu wurden 3 Proben mit bekannter IgE-Konzentration gemessen:

Probe	Erwartet [kU/l]	Gemessen [kU/l]	Wiederfindung [%]
1	350	320,21	96,9
2	80	72,21	90,3
3	70	67,80	91,5

Linearität

Die Linearität zeigt die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis proportional zur Analytkonzentration in einer Probe zu liefern. Sie wurde mittels einer seriellen Verdünnung von 5 Serumproben nachgewiesen.

Für IgE in Serum und Stuhl wurde ein lineares Verhalten im Bereich von 0,074 bis 15,38 kU/l nachgewiesen. Die Nicht-Linearität lag bei weniger als $\pm 20\%$. Folgende Werte wurden ohne Berücksichtigung der Probenverdünnung ermittelt:

Probe	Verdünnung	Erwartet [kU/l]	Gemessen [kU/l]	Wiederfindung [%]
A	1:30	10,31	10,31	-
	1:50	6,19	6,65	107,4
	1:70	4,42	3,84	86,9
B	1:30	15,38	15,38	-
	1:50	9,23	9,70	105,1
	1:70	6,59	6,96	105,6

Probe	Verdünnung	Erwartet [kU/l]	Gemessen [kU/l]	Wiederfindung [%]
C	1:30	6,52	6,52	-
	1:50	3,91	3,80	97,2
	1:70	2,79	2,88	102,9
D	1:50	2,96	2,96	-
	1:100	1,48	1,44	97,0
	1:200	0,74	0,74	99,2
E	1:50	3,12	3,12	-
	1:100	1,56	1,60	102,4
	1:200	0,78	0,79	101,1

Analytische Sensitivität

Der im Folgenden aufgeführte Wert wurde in Bezug auf die Standardkurve ohne Berücksichtigung eventuell verwendeter Probenverdünnungsfaktoren ermittelt. Hierzu wurde der Leerwert 24-mal gemessen.

Leerwert (*limit of blank*, LoB):

0,048 kU/l

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.

- Das 10x Waschpufferkonzentrat (WASHBUF) enthält Tenside, welche bei Augenkontakt zu schweren Augenreizungen führen können.

Achtung: Verursacht schwere Augenreizung. **BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN:** Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurückzusenden.

Verwendete Symbole:

	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		Reizend

IgE ELISA

*For the in vitro determination of IgE
in serum and stool*

Valid from 2023-03-13

REF K 6511



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. INTRODUCTION	17
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	18
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	19
<i>Extraction of the stool samples</i>	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference range</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
<i>Accuracy - Precision</i>	23
<i>Linearity</i>	24
<i>Accuracy - Trueness</i>	25
<i>Analytical sensitivity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	26
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik AG assay is an enzyme immunoassay intended for the quantitative determination of IgE in serum and stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Immunoglobulin E (IgE) has been demonstrated in several human secretions and fluids, such as respiratory tract mucous and saliva, urine, tears, human milk as well as in intestinal juices.

The IgE is responsible for various hypersensitivity reactions of the immediate type (Type-I-hypersensitivity). Polyvalent antigens trigger B-cells to produce specific IgE in large amounts. The released IgE antibodies bind to the Fc receptor on the surface of mast cells. The next time the sensitised person has contact to the allergen, it cross links the IgE on the surface of the mast cells and thereby triggers the mast cells to release histamine, which cause the various symptoms.

IgE is involved in a number of allergic phenomena such as erythema, anaphylaxis, homocytotropic histamine release, skin-sensitisation and atopic reaction. In patients suffering from allergy, the IgE levels increase as much as three to four times compared to the healthy.

Indications

- Diagnosis of allergy and atopic disease in infants with relapsing, spastic bronchitis, pseudocroup, etc.
- Food allergy and intolerances
- Immunodeficiency syndromes
- Differential diagnosis of eczema, respiratory tract disease, rhinopathy, urticaria and other allergy related reactions

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6511	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10 x	2 x 100 ml
K 6511	CONJ	Conjugate concentrate (anit-IgE), peroxidase-labelled	1 x 150 µl
K 6511	STD	Standards, ready-to-use (0; 0.62; 2.5; 10; 40 kU/l)	5 x 1 ml

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 6511	CTRL 1	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml
K 6511	CTRL 2	Control, ready-to-use (see specification for range)	1 x 1 ml
K 6511	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer, ready-to-use	1 x 50 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	1 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Stool sample application system such as Cat. No.: K 6998SAS
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge
- Vortex
- Standard single-use laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.

- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37°C. The **WASHBUF** is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8°C for 1 month**.
- **Preparation of the conjugate:** Before use, the **conjugate concentrate (CONJ)** has to be diluted **1:101** in wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml wash buffer). The CONJ is stable at **2–8°C** until the expiry date stated on the label. **Conjugate** (1:101 diluted CONJ) **is not stable and cannot be stored**.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8°C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Serum

Serum samples must be diluted **1:50** before performing the assay,

e.g. **20 µl** sample + **980 µl** sample dilution buffer (SAMPLEBUF), mix well.

100 µl of the dilution are used in the test.

Extraction of the stool samples

Wash buffer (1:10 diluted WASHBUF) is used as a **sample extraction buffer**. We recommend the following sample preparation:

Stool Sample Application System (SAS) (Cat. No.: K 6998SAS)

Stool sample tube – Instructions for use

Please note that the dilution factor of the final stool suspension depends on the amount of stool sample used and the volume of the buffer.

SAS with 0.75 ml sample extraction buffer:

Applied amount of stool:	15 mg
Buffer Volume:	0.75 ml
Dilution Factor:	1:50

Please follow the instructions for the preparation of stool samples using the SAS as follows:

- a) The raw stool sample has to be thawed. For particularly heterogeneous samples we recommend a mechanical homogenisation using an applicator, inoculation loop or similar device.
- b) Fill the **empty stool sample tube** with **0.75 ml sample extraction buffer** (1:10 diluted WASHBUF) before using it with the sample. **Important:** Allow the sample extraction buffer to reach room temperature.
- c) Unscrew the tube (yellow part of cap) to open. Insert the yellow dipstick into the sample. The lower part of the dipstick has notches which need to be covered completely with stool after inserting it into the sample. Place dipstick back into the tube. When putting the stick back into the tube, excess material will be stripped off, leaving 15 mg of sample to be diluted. Screw tightly to close the tube.
- d) Shake the tube well until no stool sample remains in the notches. Important: Please make sure that you have a maximally homogenous suspension after shaking. Especially with more solid samples, soaking the sample in the tube with sample extraction buffer for ~ 10 minutes improves the result.
- e) Allow sample to stand for ~10 minutes until sediment has settled. Floating material like shells of grains can be neglected.
- f) Carefully unscrew the complete cap of the tube including the blue ring plus the dipstick. Discard cap and dipstick. Make sure that the sediment will not be dispersed again.

Dilution I: 1:50

For analysis, pipet **100 µl** of **dilution I** per well.

Sample storage

Dilution I is stable for approximately 1 month at -20 °C.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This ELISA is designed for the quantitative determination of IgE.

In a first incubation step, the IgE in the samples is bound to polyclonal antibodies (in excess), which are immobilised to the surface of the microtiter wells. To remove all unbound substances, a washing step is carried out. In a second incubation step,

a peroxidase-labelled anti-IgE (POD-Antibody) antibody (polyclonal) is added. After another washing step, to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate, Tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stop solution is then added to stop the reaction. The colour converts from blue to yellow. The intensity of the yellow colour is directly proportional to the concentration of IgE. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. IgE, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (15–30°C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Before use , wash the wells 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
2.	Add each 100 µl standards/controls/diluted samples into the respective wells.
3.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker* .
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
5.	Add 100 µl conjugate (diluted CONJ) into each well.
6.	Cover the strips and incubate for 1 hour at room temperature (15–30°C) on a horizontal shaker* .
7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.

8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well.
9.	Incubate for 5–10 min** at room temperature (15–30 °C) in the dark .
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix well.
11.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the 4 parameter algorithm.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero standard must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

Serum and stool sample

The obtained results have to be multiplied with the **dilution factor of 50** to get the actual concentrations.

In case **another dilution factor** has been used, multiply the obtained result with the dilution factor used.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest standard can be further diluted and re-assayed. For the following analysis, the changed dilution factor has to be taken into consideration.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range

IgE (serum): < 100 kU/l

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy - Precision

Repeatability (Intra-Assay); n = 8

The repeatability was assessed with 3 serum samples under **constant** parameters (same operator, measurement system, day and kit lot).

Sample	Mean value [kU/l]	CV [%]
1	306.96	2.3
2	123.11	6.5
3	154.10	8.0

Reproducibility (Inter-Assay); n = 36

The reproducibility was assessed with 2 control samples under **varying** parameters (different operators, measurement systems, days and kit lots).

Sample	Mean value [kU/l]	CV [%]
1	1.37	13.7
2	6.50	5.0

Linearity

The linearity states the ability of a method to provide results proportional to the concentration of analyte in the test sample within a given range. This was assessed by serial dilution of 5 different serum-samples.

For IgE in serum and stool, the method has been demonstrated to be linear from 0.074 to 15.38 kU/l, showing a non-linear behaviour of less than $\pm 20\%$ in this interval.

Sample	Dilution	Expected [kU/l]	Obtained [kU/l]	Recovery [%]
A	1:30	10.31	10.31	-
	1:50	6.19	6.65	107.4
	1:70	4.42	3.84	86.9
B	1:30	15.38	15.38	-
	1:50	9.23	9.70	105.1
	1:70	6.59	6.96	105.6
C	1:30	6.52	6.52	-
	1:50	3.91	3.80	97.2
	1:70	2.79	2.88	102.9
D	1:50	2.96	2.96	-
	1:100	1.48	1.44	97.0
	1:200	0.74	0.74	99.2
E	1:50	3.12	3.12	-
	1:100	1.56	1.60	102.4
	1:200	0.78	0.79	101.1

Accuracy - Trueness

The trueness states the closeness of the agreement between the result of a measurement and the true value of the measurand. Therefore, three samples with known concentrations were tested:

Sample	Expected [kU/l]	Obtained [kU/l]	Recovery [%]
1	350	320.21	96.9
2	80	72.21	90.3
3	70	67.80	91.5

Analytical sensitivity

The following value has been estimated based on the concentrations of the standards without considering possibly used sample dilution factors. For this, the blank value was measured 24 times:

Limit of blank, LoB

0.048 kU/l

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The 10x Wash buffer concentrate (WASHBUF) contains surfactants which may cause severe eye irritation in case of eye contact.

Warning: Causes serious eye irritation. **IF IN EYES:** Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. If eye irritation persists: get medical Advice/attention.

- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant