

Gesamt IgE (Total IgE)



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Gesamt IgE in humanem Serum oder Plasma

Mikrotiterplattenversion für 96 Tests

1. Zweckbestimmung

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Gesamt IgE in humanem Serum oder Plasma. Die Bestimmung von Gesamt IgE mit dem vorliegenden Testkit ist nur in Verbindung mit dem Gold Standard Diagnostics CD Kassel Testsystem validiert und die ermittelten Leistungsdaten sind nur für die Gold Standard Diagnostics CD Kassel-Testsysteme bestimmt worden. Die Benutzung mit anderen Testsystemen muss vom Anwender validiert werden. Die Anwendung ist auf Fachpersonal beschränkt, das speziell in Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde, die unter Verwendung von IVDs durchgeführt werden.

2. Einleitung

Immunglobulin E ist ein Serumprotein und Hauptträger der Reaktivität allergischer Typ I - Reaktionen (Soforttyp). IgE zirkuliert in der Blutbahn; für die klinischen Symptome der Typ I-Reaktion ist das an die Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebundene IgE verantwortlich. Die Bindung erfolgt am Fc-Teil des IgE-Moleküls. Kommt es zu einem Kontakt eines Allergens mit dem korrespondierenden (spezifischen) zellständigen IgE, erfolgt eine Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren und Enzyme (z.B. Histamin). Der Gesamt IgE-Test misst die Gesamtheit aller spezifischen IgE-Varianten im Serum und ist somit ein Sammeltest, der zwar eine Interpretationshilfe bei der Diagnostik darstellt, aber z.B. keine Hinweise auf eine Sensibilisierung gegen ein bestimmtes Allergen gibt. Deshalb sollten die Ergebnisse bei der Bestimmung des Gesamt IgE im Serum nur Teile eines Diagnosekonzeptes sein, das sorgfältige Anamnese, Haut- und Provokationstests sowie andere In-vitro-Methoden beinhaltet.

3. Test-Prinzip

Die quantitative Bestimmung des zirkulierenden Gesamt IgE im Serum erfolgt durch einen nichtkompetitiven Enzymimmunoassay. Die Festphase besteht aus einer Mikrotiterkavität, an deren Innenfläche ein Anti-IgE adsorptiv gebunden ist. Im ersten Schritt werden Patientenserum bzw. -plasma und eine Verdünnungslösung in die Kavität pipettiert. Es erfolgt eine Bindung des Gesamt IgE an das festphasengebundene Anti-IgE. Ungebundenes Serum wird in einem Waschschritt entfernt. Im zweiten Schritt wird ein enzymmarkiertes Anti-human-IgE in die Kavität pipettiert. Es erfolgt eine Bindung des markierten Anti-human-IgE an das Gesamt IgE. Ungebundenes markiertes Anti-human-IgE wird in einem Waschschritt entfernt. Die Menge des gebundenen, markierten Anti-human-IgE ist proportional zur Menge des Gesamt IgE im Serum/Plasma. Im nächsten Schritt wird eine Substratlösung (p-Nitrophenylphosphat) hinzugegeben. Durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase entsteht eine gefärbte Lösung. Die Enzymreaktion wird am Ende der Inkubationszeit mit einer Stopplösung beendet. Die Extinktionen der gefärbten Lösungen werden im Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgt über eine Kalibrierkurve, bestehend aus den Extinktionswerten der gemessenen Kalibrator-Kavitäten.

4. Inhalt Gesamt IgE Testkit

- [CONJ.] Konjugat:** 1 Flasche mit 12 ml monoklonalem Anti-human-IgE (Maus), konjugiert mit alkalischer Phosphatase in gepufferter Eiweißlösung; Konservierungsmittel: 0,02 % Natriumazid, blau gefärbt.
- [WASH] 20x Waschlösung (Konzentrat):** 1 Flasche mit 50 ml konz. Natriumchloridlösung mit Tween 20; Konservierungsmittel: 0,05 % Natriumazid (Herstellung der Waschlösung siehe unter Punkt 10.2).
- [SUBS.] Substratlösung:** 1 Flasche mit 12 ml p-Nitrophenylphosphat (PNPP)
- [STOP] Stopplösung:** 1 Flasche mit 6 ml 1 M Natrionlauge.
- [DIL] AS Verdünnungslösung:** 1 Flasche mit 12 ml Verdünnungslösung, Konservierungsmittel: 0,05 % Natriumazid.
- [MTP] Mikrotiterplatte (abbrechbar):** 1 Mikrotiterplatte (12 Streifen mit 8 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-human-IgE (Maus)).
- [CAL] SERUM Kalibrierseren:** 5 Flaschen mit je 0,3 ml Human-IgE, kalibriert gegen WHO IRP 11/234. Konservierungsmittel: 0,02 % Natriumazid. Enthält bovinies Serumalbumin. Die Kalibratoren sind in aufsteigender Konzentration abgefüllt:

[CAL] SERUM 1	Kalibrator 1 = 0 IU/ml;
[CAL] SERUM 2	Kalibrator 2 = 50 IU/ml;
[CAL] SERUM 3	Kalibrator 3 = 100 IU/ml;
[CAL] SERUM 4	Kalibrator 4 = 200 IU/ml;
[CAL] SERUM 5	Kalibrator 5 = 1000 IU/ml.

5. Zusätzlich erforderliche Materialien und Geräte

Materialien und Geräte:

- Mikropipette mit Einmalspitzen 10 µl
- Manueller Handdispenser z.B. Eppendorf-Multipette mit Combitips 2,5 und 5 ml
- Meßzylinder 2000 ml
- Mikrotiterplattendeckel
- Einmalhandschuhe, Stoppuhr, Drucker
- Destilliertes Wasser
- Mikrotiterplattenphotometer 405/620 nm (z.B. TECAN Spectra oder TECAN Sunrise)
- Inkubator (37 °C)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (z.B. TECAN-Columbus Washer oder TECAN Hydroflex)

6. Grenzen des Verfahrens

- Verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse werden nur dann erhalten, wenn der Test ordnungsgemäß (siehe Testdurchführung Kapitel 10) durchgeführt wird.
- Werden mehrere Mikrotiterplatten in einem Test abgearbeitet, sind die **Inkubationszeiten** der einzelnen Platten unbedingt **einzuhalten**.
- Die klinische Diagnose sollte sich nicht nur auf den alleinigen Nachweis von erhöhtem oder erniedrigtem Gesamt IgE stützen, sondern auch andere klinische Daten

und Testergebnisse einschließen. Die In-vitro-Bestimmung von Gesamt IgE sollte nie als alleinige diagnostische Entscheidungsmaßnahme zur Aufnahme einer Hyposensibilisierungsbehandlung oder einer anderen Therapie herangezogen werden. Zusätzlich müssen Hauttests, andere In-vitro-Tests (z.B. Spez. IgE) und – sofern möglich – auch Provokationstests zum Nachweis der klinischen Relevanz durchgeführt werden (s. Literatur 1).

- Negative oder niedrige Gesamt IgE-Ergebnisse können u.a. vorkommen wenn:
 - die Symptome nicht IgE-vermittelt sind;
 - die Probe entnommen wurde, bevor der Organismus Antikörper gegen das Antigen bilden konnte.
 - wenn der IgE-Spiegel lange Zeit nach der Sensibilisierung wieder einen niedrigen Stand erreicht hat.
- Identische Resultate bei verschiedenen Patienten lassen nicht auf eine gleiche Reaktionslage schließen, da sie individuell verschieden ist.
- Positive Resultate bei Gesamt IgE In-vitro-Tests müssen nicht zwangsläufig mit klinischen Manifestationen einhergehen.

Erhöhte Gesamt IgE-Werte können auf das Vorliegen einer atopischen Disposition hinweisen. In besonderen Fällen kann Gesamt IgE zur ergänzenden Diagnostik von atopieassoziierten Krankheiten (z.B. Farmerlunge, Vasculitiden etc.) sowie zur Diagnostik von angeborenen und erworbenen Immundefekten (Hyper-IgE-Syndrom oder T-Zell-Defekte) herangezogen werden (s. Literatur 1). Das Gesamt IgE dient im Zusammenhang mit der Bestimmung des spezifischen IgE als zusätzlicher Parameter zur Beurteilung des spezifischen IgE-Titers, es kann aber spezifische Sensibilisierungen weder nachweisen noch ausschließen. Zum 'Atopiescreening' ist Gesamt IgE nur eingeschränkt geeignet.

7. Spezifische Leistungsdaten

Analytische Spezifität: spezifisch für humanes IgE

Präzision:

Intra-Assay-Varianz (Wiederholbarkeit)

Probe	IgE-Konz. MW [IU/ml]	VK [%]
1 (n=10)	7,01	8,52
2 (n=10)	41,28	2,86
3 (n=10)	114,15	3,26
4 (n=10)	334,28	8,10
5 (n=10)	659,28	1,76

Inter-Assay-Varianz (Reproduzierbarkeit)

Probe	IgE-Konz. MW [IU/ml]	VK [%]
1 (n=10)	6,86	14,13
2 (n=10)	41,34	5,98
3 (n=10)	126,75	7,60
4 (n=10)	381,00	4,22
5 (n=10)	676,68	3,47

Richtigkeit:

Im Messbereich 5-100 IU/ml: 97%
Im Messbereich 100-1000 IU/ml: 138 %

Linearität:

Mit 3 Proben (ca. 900 IU/ml) wurde bei 7 aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen ein mittlerer Interverdünnungs-VK von 16,7% (Basis: IU/ml) ermittelt. Abweichende Ergebnisse können aber aufgrund variierender Zusammensetzung des humanen Probenmaterials gefunden werden.

Analytische Sensitivität:

Der Anstieg zwischen den Kalibrierpunkten beträgt mindestens

KAL 1 zu 2:	≥ 0,0041
KAL 2 zu 3:	≥ 0,0064
KAL 3 zu 4:	≥ 0,0040
KAL 4 zu 5:	≥ 0,0016

Untere Nachweisgrenze

< 5 IU/ml

Messbereich

5 – 1000 IU/ml

Metrologische Rückverfolgbarkeit der Gesamt IgE Kalibrierreihe:

WHO IRP 11/234

Auf Anfrage können weitere Leistungsdaten von Gold Standard Diagnostics CD Kassel zur Verfügung gestellt werden.

8. Einschränkungen und Interferenzen

Analytische Spezifität

Substrat	Maximale Konzentration	Keine Beeinträchtigung
Triglyceride	≤ 5 mg/ml	Keine Beeinträchtigung
Hämolystat	≤ 3 mg/ml	
Protein	≤ 80 mg/ml	
Bilirubin konjugiert	≤ 0,05 mg/ml	
Bilirubin unkonjugiert	≤ 0,15 mg/ml	
IgA	≤ 4 mg/ml	
IgD	≤ 0,3 mg/ml	
IgM	≤ 4,6 mg/ml	
IgG	≤ 25 mg/ml	

Abweichende Ergebnisse können aber aufgrund variierender Zusammensetzung des humanen Probenmaterials gefunden werden

9. Probengewinnung und -lagerung

Es kann Serum und Plasma eingesetzt werden, das bis zu 5 Tage bei 2 – 8 °C gelagert werden kann. Sollte der Test nicht innerhalb dieser Zeit durchgeführt werden, empfiehlt sich das Einfrieren bei –20 °C (Haltbarkeit bei –20 °C mind. 6 Monate). Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden!

10. Durchführung des Analysenverfahrens

1. Vor Testbeginn sind alle Komponenten auf Raumtemperatur (RT, 20 – 25 °C) zu erwärmen.
2. Zubereitung der Waschlösung: 50 ml des Waschlösungskonzentrates werden mit dest. Wasser auf 1000 ml verdünnt und gut vermischt. Nach Verdünnung ist die Waschlösung bei Verwendung gründlich gereinigter Gefäße 24 h bei RT haltbar.
3. Erstellung eines Verteilungsschemas für Kalibratoren und Untersuchungsproben.

Bitte beachten: Eine Doppelbestimmung der Kalibratorwerte ist notwendig.

4. Je 10 µl Kalibrierseren 1 – 5 und dann je 10 µl der Serum-/Plasmaproben in die vorgesehenen Vertiefungen pipettieren (auf den Boden der Vertiefung). Die Vertiefung A1 (Blank) bleibt frei.
5. Je 100 µl Verdünnungslösung in alle Vertiefungen pipettieren (inkl. Blank).
6. Mikrotiterplatte bedecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
7. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten entweder mit dem automatischen Waschgerät (4x) oder mit dem manuellen Waschgerät waschen (5x, bitte unbedingt dabei Bedienungsanweisung beachten!). Es dürfen nur die von Gold Standard Diagnostics CD Kassel freigegebenen Waschprozeduren benutzt werden.
8. Je 100 µl blaues Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren (inkl. Blank).
9. Mikrotiterplatte bedecken und 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
10. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten entweder mit dem automatischen Waschgerät (4x) oder mit dem manuellen Waschgerät waschen (5x, bitte unbedingt dabei Bedienungsanweisung beachten!). Es dürfen nur die von Gold Standard Diagnostics CD Kassel freigegebenen Waschprozeduren benutzt werden.
11. Jeweils 100 µl Substratlösung in sämtliche Vertiefungen pipettieren (inkl. Blank).
12. Mikrotiterplatte wieder abdecken und unter Lichtabschluß 1 Stunde bei 37 °C inkubieren.
13. In der gleichen Weise und Reihenfolge wie bei Pipettieren der Substratlösung jetzt jeweils 50 µl Stopplösung in alle Vertiefungen geben (inkl. Blank).
14. Nach Abstoppen der Reaktion mit Stopplösung ist der Farbkomplex innerhalb von 30 Minuten zu messen. Die Mikrotiterplatte mit der abgestoppten Farblösung wird in das Photometer gegeben. Die Messung erfolgt bei 405/620 nm.
15. Bei jedem Testlauf sollten Werte zur Qualitätskontrolle (Positivkontrollen) mitgemessen werden.

Achtung! Sind wesentliche Änderungen am Testablauf vorgenommen worden (z. B. Zeit, Abfolge, Temperatur etc.) oder sind auch bei korrekter Anwendung wesentliche Beeinträchtigungen der Analysenleistung zu sehen (z. B. Kontrollserenwerte außerhalb des erlaubten Bereiches, stark differierende Doppelwerte etc.), so dürfen die erhaltenen Werte nicht weiter verwendet werden. Eine Überprüfung des Systems bzw. der Abarbeitung ist vor der Fortführung der Arbeiten unbedingt nötig. Bitte wenden Sie sich dazu in Zweifelsfällen an die Fachmitarbeiter/innen von Gold Standard Diagnostics CD Kassel.

11. Berechnung

Bei Geräten von Gold Standard Diagnostics CD Kassel erfolgt die Berechnung der Kalibrierkurve und die Auswertung der Messergebnisse automatisch.

Gesamt IgE- Standard	Konzentration
1	0 IU/ml
2	50 IU/ml
3	100 IU/ml
4	200 IU/ml
5	1000 IU/ml

Manuell kann die Kalibrierkurve berechnet werden, indem die für die Kalibratoren ermittelten Extinktionen gegen die Kalibrator-Unit-Werte auf halb-logarithmischem Papier aufgetragen und die einzelnen Punkte mit einem Lineal verbunden werden. Diese Kalibrierkurve dient zur Ermittlung der Werte der Serum-/Plasmaproben. Hinweis: erst Ergebnisse ≥ 5 IU/ml bewerten, Ergebnisse < 5 IU/ml werden in der Allevance Software mit 0 ausgegeben.

12. Normalwerte für Gesamt IgE

Werte über 100 IU/ml können bei Erwachsenen auf eine mögliche Atopie hinweisen. Siehe auch Kapitel 6 „Grenzen des Verfahrens“ und die Literatur 1. Normwerte für Kinder siehe Literatur 3.

13. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Folgende Regeln müssen beachtet werden:

1. Beim Umgang mit den Testbestandteilen sind die einschlägigen Sicherheitsvorschriften zu beachten!
2. Kalibratoren und Untersuchungsproben stellen potentiell infektiöse Substanzen dar. Zwecks Desinfektion kontaminierter Bereiche sind geeignete Mittel/Verfahren einzusetzen. Die Referenzen zeigen keine Reaktivität gegenüber HBsAg (Hepatitis B Surface Antigen), HCV und HIV-1/2.
3. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen. Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. Bei Berührung mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort Giftnormszentrum oder Arzt anrufen. Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
4. Im Labor sind Rauchen, Essen und Trinken untersagt.
5. Pipetten nicht mit dem Mund ansaugen!
6. Alle Reagenzien nach Gebrauch wieder verschließen. Die Verschlüsse dürfen nicht vertauscht werden.
7. Keine beschädigten oder kontaminierten Kit-Komponenten verwenden.
8. Beim Pipettieren Kreuzkontamination verhindern!
9. Es dürfen keine Testkomponenten unterschiedlicher Chargen miteinander gemischt werden.
10. Reagenzien dürfen nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr eingesetzt werden.
11. Die Messungen und Qualitätskontrollen sollten analog ablaufen, um die Gleichförmigkeit der Testbedingungen abzusichern.
12. Funktionalität und Genauigkeit der verwendeten Geräte (Pipetten, Photometer etc.) müssen regelmäßig überprüft werden. Die Anweisungen des Herstellers müssen beachtet werden!
13. Jeder schwerwiegende Vorfall, der sich im Zusammenhang mit diesem Produkt ereignet hat, sollte dem Hersteller und der Aufsichtsbehörde des Landes, in dem der Anwender und/oder Patient ansässig ist, gemeldet werden.
14. Reagenzien und Chemikalien müssen gemäß geltenden Bestimmungen behandelt und entsorgt werden. Liste der gelieferten Stoffe, die bei der Entsorgung ggf. besonders behandelt werden müssen:
 - Konjugat (Natriumazid $< 0,1$ % w/w CAS 26628-22-8; Bovines Serumalbumin CAS 90604-29-8)

- Waschlösung (Natriumazid $< 0,1$ % w/w CAS 26628-22-8)
- Substrat (p-Nitrophenylphosphat CAS 4264-83-9)
- Stopplösung (Natronlauge 1 M CAS 1310-73-2)
- Kalibratoren (Natriumazid $< 0,1$ % w/w CAS 26628-22-8; Bovines Serumalbumin CAS 90604-29-8; Humanserum)

14. Qualitätskontrolle

- Interne Qualitätskontrolle
Es wird empfohlen, bei jedem Testsatz ist mindestens ein Positivkontrollserum wie Patientenserum im Test einzusetzen. Gold Standard Diagnostics CD Kassel bietet solche Kontrollseren an. Für Positivkontrollen werden Normbereiche von Gold Standard Diagnostics CD Kassel angegeben. Wenn die Positivkontrolle im Normbereich liegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Testmethode korrekt arbeitet.
Es wird empfohlen, Qualitätsregelkarten zu führen.
- Externe Qualitätskontrolle
Es wird empfohlen, an externen Qualitätskontrollen (Ringversuche) teilzunehmen. Dabei werden von einem Ringversuchsveranstalter Proben versandt, deren analytische Konzentrationen dem an der externen Qualitätskontrolle teilnehmenden Labor unbekannt sind. Der Ringversuchsveranstalter wertet nach Sammlung der Ergebnisse aller Einsender die Resultate aus und beurteilt sie. Einzelheiten müssen vom Ringversuchsveranstalter erfragt werden. Bitte wenden Sie sich an Gold Standard Diagnostics CD Kassel bzw. Ihren In-vitro Außendienst.

15. Lagerung des Testkits

2 – 8 °C

16. Haltbarkeit

Das Testkit erfüllt seine Spezifikation bis zum angegebenen Verfallsdatum des Testkits und der Komponenten. Das Verfallsdatum ist der letzte Tag des auf dem Testkit oder Komponenten angegebenen Monats. Keine Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums benutzen.

17. Literatur

1. Ring J., 1992, Angewandte Allergologie, MMW Verlag, München
2. R. Wahl, R. Krause: Methoden der In-vitro-Allergiediagnostik und deren Stellenwert unter Berücksichtigung ihrer technischen Aspekte. Allergologie 33/3, 2010, 121-133.
3. Renz H., et al.: In-vitro-Allergiediagnostik, Leitlinie der DGAKI, ÄDA, GPA und DGG, Allergo Journal 2010; 19: 110 – 128.

18. Gültigkeit

Diese Arbeitsanleitung ist ab 01.10.2022 gültig.

19. Bestellinformation

Gesamt IgE (Total IgE) Bestellnummer
REF 36090000

20. Hersteller/Vertreiber

 **Gold Standard Diagnostics CD Kassel GmbH**
Otto-Hahn-Straße 16
D-34123 Kassel – Germany
☎ +49 561 491742 0
Fax +49 561 491742 20

 **Gold Standard Diagnostics Kassel GmbH**
Otto-Hahn-Straße 16
D-34123 Kassel – Germany
☎ +49 561 491742 0
Fax +49 561 491742 20