

Arbeitsanleitung

**immuno^{LINE}
IgE Atopie**

Enzymimmunoassay auf Nitrozellulosestreifen
zum Nachweis von humanen IgE-Antikörpern gegen
20 Allergene in Serum und Plasma



Kat.-Nr.: ILE-LBL23
Lagerung: 2-8°C
Nur für in-vitro Diagnostik

Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Verwendungszweck	3
2. Klinische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	4
5. Inhalt des Testbestecks	4
6. Belegungsplan	5
7. Erforderliche Geräte und Hilfsmittel	6
8. Gewinnung, Vorbereitung und Aufbewahrung der Proben	6
9. Testdurchführung	6
10. Auswertung	7
11. Kurzanleitung	8
12. Literatur	8

Symbole und Übersetzungen

Symbol	English	French	German	Italian	Spanish	Greek
STRIP	Test strip	Membran	Teststreifen	Membrane	Tira de prueba	Δοκιμή της Γάζας
CONJ	Conjugate	Conjugué	Konjugat	Coniugato	Conjugado	Διάλυμα Συμπλόκου
SAMP DIL	Sample Diluent	Diluant échantillon	Proben-verdünner	Diluyente del campione	Diluyente de muestra	Διάλυμα Αραίωσης Δειγμάτων
WASH BUF	Wash buffer	Tampon de lavage	Waschpuffer	Soluzione di lavaggio	Tampón de lavado	Πλυστικό Διάλυμα
CONC	Concentrate (<n>-fold)	Concentré (<n> fois)	Konzentrat (<n>-fach)	Concentrato (<n>-volte)	Concentrado (<n>-veces)	Συμπύκνωσ η (<n> φορές)
SUBS	Substrate	Substrat	Substrat	Substrato	Sustrato	Διάλυμα Υποστρώματος

1. Verwendungszweck

Der GOLD STANDARD DIAGNOSTICS immuno^{LINE} IgE Atopie Testkit dient dem Nachweis von spezifischen IgE-Antikörpern gegen Allergene im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind ggf. möglich und können beim technischen Service von Gold Standard Diagnostics Kassel GmbH erfragt werden.

Dieser Test ist nur für *in-vitro*-diagnostische Anwendungen durch geschultes Laborpersonal bestimmt. Die manuelle Abarbeitung wird empfohlen. Der darüberhinausgehende Einsatz von Laborautomaten liegt in der Verantwortung des Anwenders.

Die einzelnen Nitrozellulosestreifen sind nur für den einmaligen Gebrauch vorgesehen.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mitberücksichtigt werden.

2. Klinische Bedeutung

Immunglobulin E (IgE) repräsentiert eine besondere Klasse von Immunglobulinen, die bei der allergischen Reaktion von Bedeutung ist. Der Wirkungsmechanismus besteht aus einer initialen antigenen Stimulation der immunkompetenten B-Lymphozyten durch ein spezifisches Allergen, ein Prozess, der bei Lymphozyten zu einer Reaktion durch Produktion von spezifischen Antikörpern mehrerer Klassen führt.

Eine Klasse, die Reagin- oder IgE Antikörper werden über ihren Fc-Teil teilweise an Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Leukozyten gebunden. Nach weiterer Stimulation durch spezifische Allergene binden sich diese zellgebundenen IgE-Moleküle über ihren Fab-Teil an das Allergen. Diese Kombination stimuliert die Mastzellen und Basophilen zur Freisetzung von verschiedenen vasoaktiven Aminen in das Blut und das unmittelbar benachbarte Gewebe. Die Substanzen erzeugen eine Kontraktion der glatten Muskulatur und führen schließlich zu allergischen Zuständen wie Rötung und Urtikaria, Dermatitis, Rhinitis, Heuschnupfen, Asthma und anaphylaktischen Schock.

Die Bestimmung von IgE ist besonders bei der diagnostischen Beurteilung von Patienten mit bestätigter oder vermuteter allergischer Erkrankung von Bedeutung. Bei gesunden Personen verhalten sich die Konzentrationen von IgE-Antikörpern altersabhängig, mit einem Maximum zwischen 10 und 14 Jahren. Säuglinge und Kinder mit der Familienanamnese einer atopischen Allergie tragen ein erhöhtes Risiko, eine Erkrankung zu entwickeln, und sind die Hauptzielgruppe für Screeninguntersuchungen. Verschiedene Studien zeigten, dass Krankheitszustände wie Asthma, Rhinitis, Urtikaria, Dermatitis und einige parasitäre Infektionen zu erhöhten IgE-Spiegeln führen. Patienten mit Asthma, Heuschnupfen und atopischen Ekzemen können 3-10 mal höhere Spiegel als gesunde Patienten aufweisen.

Zirkulierende allergenspezifische IgE Antikörper können durch festphasen-gekoppelte Allergene nachgewiesen werden. Bei Verwendung eines enzymmarkierten anti-IgE als Sekundärantikörper wird der Test EAST genannt.

3. Testprinzip

Der GOLD STANDARD DIAGNOSTICS immuno^{LINE} IgE Atopie Testkit basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). 16 Patienten können mit jedem Kit getestet werden. Pro Patient wird ein Streifen benötigt. Auf jedem Streifen sind 20 verschiedene Allergene inkl. CCD sowie eine Kontrolllinie für die Testauswertung in parallelen Linien beschichtet. CCD dient dem Nachweis von Antikörpern mit geringer klinischer Relevanz. Gefolgt von einer Konditionierung mit Probenverdünner werden die Streifen mit der Probe inkubiert. Es findet eine Bindung zwischen den IgE Antikörpern aus dem Serum und den immobilisierten Allergenen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges anti-human-IgE-AP Konjugat zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (BCIP/NBT) pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch auf dem Streifen im Fall einer positiven Reaktion ein Farbstoff präzipitiert. Die Farbentwicklung wird durch Spülen der Streifen

mit Waschlösung beendet. Die Konzentration der allergenspezifischen IgE Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für *in-vitro* Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (z.B. Scanner für die Testauswertung).
- Der Kontakt vor allem des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.
- Keins der Reagenzien enthält humanes Material. Trotzdem sollten Proben als potentiell infektiös betrachtet und Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß nationaler Bestimmungen für Gefahrstoffe erfolgen. Bitte beachten Sie, dass Verbrauchsmaterialien nach der Benutzung mit Patientenproben, d.h. mit potenziell infektiösen Stoffen menschlichen Ursprungs, kontaminiert wurden.
- Alle Vorkommnisse in Verbindung mit dem vorliegenden Produkt, die unmittelbar oder mittelbar zum Tod oder zu einer schwerwiegenden Verschlechterung des Gesundheitszustands einer Person geführt haben, geführt haben könnten oder führen könnten, sind dem Hersteller und den zuständigen Behörden unverzüglich zu melden.

5. Inhalt des Testbestecks

Komponenten	Volumen / Menge
[STRIP] Allergenbeschichtete Nitrozellulose Teststreifen	16
[CONJ] Enzymkonjugat	9 mL
[SAMP DIL] Probenverdünner	60 mL
[WASH BUF] [CONC] Waschpuffer (10×)	60 mL
[SUBS] Substratlösung	18 mL
Inkubationswanne	1
Auswerteschablone	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von sechs Monaten verbraucht werden.

Produktübergreifende Reagenzien

Waschpuffer, Probenverdünner und Substratlösung sind für alle IgE Screen Lineblot Testkits von Gold Standard Diagnostics Kassel GmbH mit Alkalischer Phosphatase als Nachweisenzym identisch und können zwischen Produkten und Chargen ausgetauscht werden. Alle weiteren Reagenzien sind einer bestimmten Kitcharge zugeordnet und dürfen nicht miteinander vermischt werden.

5.1. **STRIP** Nitrozellulose Teststreifen

16 Streifen für 16 Patienten. Auf jedem Streifen sind 20 verschiedene Allergene inkl. CCD zum Nachweis von Antikörpern von geringer klinischer Relevanz sowie eine Kontrolllinie beschichtet (siehe Belegungsplan). Gebrauchsfertig.

5.2. **CONJ** Enzymkonjugat

9 mL, Maus-anti-human-IgE-AP, in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01% Methylisothiazolon, 0,01% Bromonitrodioxan und 5 mg/L Proclin™. Gebrauchsfertig.

5.3. **SAMP DIL** Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,05% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.4. **WASH BUF** **CONC** Waschpuffer

60 mL, TBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen. Der verdünnte Waschpuffer kann bei 2-8°C für 4 Wochen gelagert werden.

5.5. **SUBS** Substratlösung

18 mL, BCIP/NBT. Gebrauchsfertig.

5.6. Inkubationswanne

Mit 8 Kanälen für die Inkubation von 8 Teststreifen.

5.7. Auswerteschablone

5.8. Arbeitsanleitung

6. Belegungsplan

Eine Kontrolllinie sowie 20 verschiedene Allergene incl. CCD für den Nachweis von Antikörpern mit geringer klinischer Relevanz sind auf den Teststreifen in der folgenden Reihenfolge angeordnet:

CL	Kontrolle
1	Eiklar (f1)
2	Kuhmilch (f2)
3	Weizenmehl (f4)
4	Erdnuss (f13)
5	Sellerie (f85)
6	Dorsch (f3)
7	Lieschgras (g6)
8	Ambrosie, beifußblättrig (w1)
9	Beifuß (w6)
10	Spitzwegerich (w9)
11	Birke (t3)
12	Hasel (t4)
13	Katzenepithelien (e1)
14	Hundeepithelien (e2)
15	Derm. pteronyssinus (d1)

CL	Kontrolle
16	Derm. farinae (d2)
17	Penicillium chrysogenum (m1)
18	Cladosporium herbarum (m2)
19	Aspergillus fumigatus (m3)
20	CCD (o214)

7. Erforderliche Geräte und Hilfsmittel

- Mikropipetten
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung (optional)
- Horizontalschüttler
- Vakuumpumpe
- Bidestilliertes Wasser

8. Gewinnung, Vorbereitung und Aufbewahrung der Proben

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die schnelle und empfindliche Bestimmung werden die Proben 1:5 in gebrauchsfertigem Probenverdünner (100 µL Serum + 400 µL Probenverdünner) getestet. unverdünnt getestet. Wenn nicht genug Probenvolumen zur Verfügung steht, kann die Probe 1:10 verdünnt (50 µL Serum + 450 µL Probenverdünner) und entsprechend der alternativen Methode wie im Kapitel „Testdurchführung“ beschrieben getestet werden.

9. Testdurchführung

9.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: Vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Der Ausfall von Kristallen nach gekühlter Lagerung ist unbedenklich. Zur Entfernung sollte das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmt werden.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht aber nicht länger als nötig bei dieser Temperatur aufbewahrt werden.

9.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Die benötigte Anzahl an Teststreifen in die Inkubationswanne legen. Die auf jedem Streifen aufgebrachte Markierung muss nach oben weisen.
2. In jeden Kanal 1 mL Probenverdünner pipettieren und die Teststreifen für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren. Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen.
3. 0,5 mL 1:5 verdünnte Probe in jeden Kanal der Inkubationswanne pipettieren und die Teststreifen für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren. Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen.

Anmerkung: Zur leichteren Handhabung kann die Probe direkt im Inkubationskanal verdünnt und gemischt werden. Füllen Sie dazu 0,4 mL Probenverdünner in den Kanal und geben Sie 100 µL Probe hinzu. Sofort nach Zugabe der Probe mit dem Schütteln beginnen.

4. 2 mL verdünnten Waschpuffer in jeden Kanal der Inkubationswanne pipettieren und die Teststreifen für 2 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler spülen.

Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt.

5. 0,5 mL gebrauchsfertiges Konjugat in jeden Kanal der Inkubationswanne pipettieren und die Teststreifen für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren. Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen.
6. Den Waschschrift wie in Punkt 4. beschrieben wiederholen.
7. 1 mL gebrauchsfertiges Substrat in jeden Kanal der Inkubationswanne pipettieren und die Teststreifen für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubieren. Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen.
8. 1 mL verdünnten Waschpuffer zum Stoppen der Substratreaktion in jeden Kanal der Inkubationswanne pipettieren. Anschließend die Lösung mit einer Vakuumpumpe absaugen.
9. Die Teststreifen an der Luft trocknen und auswerten.

Anmerkung: Die Geschwindigkeit des in allen Inkubationsschritten verwendeten Horizontalschüttlers ist abhängig von der Geometrie des einzelnen Instruments. Validierungsexperimente zeigten, dass eine Geschwindigkeit von > 90/min mit gängigen Geräten zu zuverlässigen Ergebnissen führt.

Alternative Methode: Steht nur wenig Probe zur Verfügung, kann diese 1:10 in Probenverdünner verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert werden (Punkt 3. der o.g. Durchführung). Konjugat- (Punkt 5.) und Substrat-Inkubation (Punkt 7.) werden jeweils auf 60 Minuten verlängert. Alle weiteren Schritte werden wie beschrieben ausgeführt.

10. Auswertung

Feuchte Teststreifen können eine Hintergrundfärbung aufweisen, die beim Trocknen verschwindet. Aus diesem Grund werden nur die vollständig getrockneten Streifen ausgewertet.

Einige Proben ergeben eine Hintergrundfärbung, die nicht beim Trocknen verschwindet. In diesem Fall kann an der Stelle der aufgetragenen Proteine eine weiße Linie erscheinen. Diese Signale werden als negativ interpretiert.

Einige Proben zeigen sehr schwache Reaktionen gegen eine Vielzahl von Allergenen. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass diese Proben zu unspezifischen Reaktionen neigen, und sie sollten daher als negativ auf alle Allergene mit schwachem Signal betrachtet werden. Als eine Hilfestellung kann die CCD Linie berücksichtigt werden. Ein positives Signal der CCD Linie in Kombination mit zahlreichen weiteren positiven Reaktionen deutet auf kreuzreagierende Antikörper mit geringer klinischer Bedeutung hin.

Ein Testlauf wird als valide angesehen, wenn sich während der Substratinkubation eine deutlich sichtbare Kontrolllinie entwickelt. Diese Linie erscheint auch, wenn alle Allergene ein negatives Ergebnis zeigen. Die Kontrolllinie ist das erste Signal nach der Identifizierungsnummer, die direkt auf dem Streifen aufgebracht ist.

10.1. Visuelle Methode

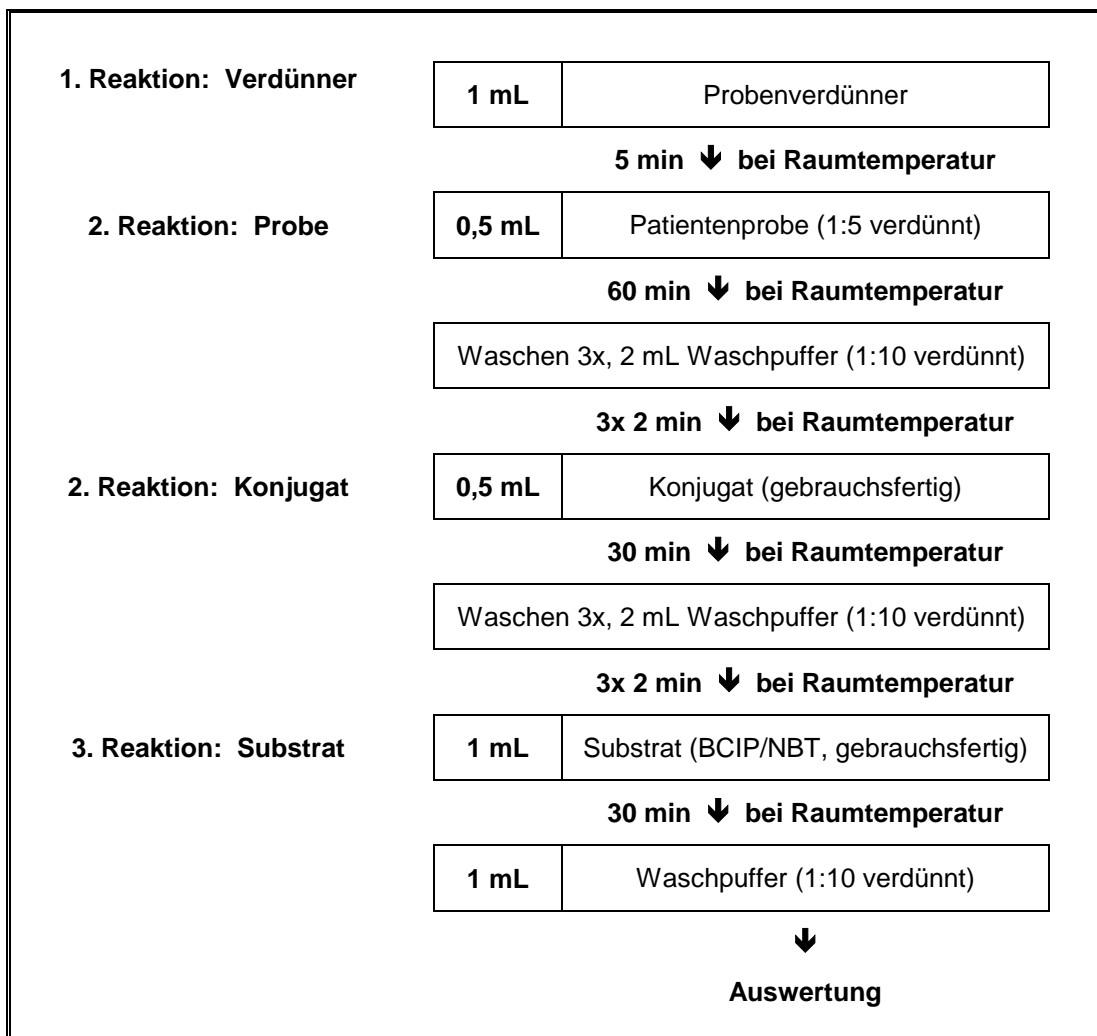
Die Kontrolllinie („CL“) der getrockneten Teststreifen wird auf der Auswerteschablone mit der entsprechenden Markierung in Übereinstimmung gebracht. Die weiteren Linien 1-20 zeigen die Position der beschichteten Allergene in der im Punkt „Belegungsplan“ angegebenen Reihenfolge. Die Signale werden für jedes Allergen entsprechend dem folgenden Schema interpretiert:

Klasse	Signal	Interpretation
0	kein Signal oder schwache Signale gegen zahlreiche Allergene	negativ
1	schwaches Signal	grenzwertiges Ergebnis
2	mittleres Signal	positives Ergebnis
3	intensives Signal	stark positives Ergebnis

10.2. Scanner-Methode

Der GOLD STANDARD DIAGNOSTICS immuno^{LINE} IgE Atopie Lineblot Test kann auch mit einem Scanner in Kombination mit der immuno^{LINE} Evaluation Tool Software von Gold Standard Diagnostics Kassel GmbH quantitativ ausgewertet werden. Für Details siehe die Bedienungsanleitung der Software.

11. Kurzanleitung



12. Literatur

- Ishizaka, K., Ishizaka, T. und Hornbrook, M.M.: Physicochemical Properties of Human Reaginic Antibody IV. Presence of a Unique Immunoglobulin as a Carrier of Reaginic Activity. *J. Imm.* 97, 75 (1966)
- Hamilton, R.: Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease. *Ligand Quarterly* 2, 13 (1979)
- Johansson, S., Bennich, H. und Berg, T.: The Clinical Significance of IgE. *Progress in Clin. Immunology* 1 (1972)
- Kjellman, M.: Immunoglobulin E and Atopic Allergy in Childhood. Linköping University Medical Dissertations, Nr. 36 (1976)
- Wittig, H., Bellott, J., Fillippi, I. und Royal, G.: Age-Related Serum IgE Levels in Health Subjects and in Patients with Allergic Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 305 (1980)
- Gleich, G., Averbek, A. und Swedlund, H.: Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay. *J. Lab. and Clin. Med.* 77, 690 (1971)