

Testansatz

|  |
|--|
| 1 Kugel  |
| 100 µl Standards, Kontrollen und Proben laut Pipettierschema pipettieren |
| 100 µl Tracer in alle Plastikröhrchen (12*75) pipettieren                |
| den Testansatz mindestens <b>10 h</b> bei Raumtemperatur inkubieren      |
| Waschen mit 2 * 4 ml aqua dest. (z.B. mit dem Immunwasher von Berthold)  |
| den Überstand dekantieren oder absaugen                                  |
| die gebundene Aktivität im Luminometer 2 Sekunden zählen.                |

Standards

Bei der Auswertung ist darauf zu achten, daß die folgenden Konzentrationen Verwendung finden:

|                              |          |             |            |             |             |
|------------------------------|----------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Standard                     | 0        | 1           | 2          | 3           | 4           |
| <b>Konzentration [ng/g]:</b> | <b>0</b> | <b>62,5</b> | <b>250</b> | <b>1000</b> | <b>4000</b> |

Die Konzentrationsangabe der Standards sind Nominalwerte, und beziehen sich auf die Verdünnung der Proben (1/10). Damit kann die Konzentration auf einen Gramm Stuhl ermittelt werden. Bei der Verwendung anderer Verdünnungen muß die reale Standardkonzentration angenommen werden. Die geschieht in dem die nominale Konzentration (Tabelle) durch 10 geteilt wird.

Auswertung

**Auswertung:** Nach dem Zählen der gebundenen Aktivität werden die Ergebnisse der Probenkonzentrationen

- automatisch berechnet (Auswerteverfahren: Spline-Approximation, Four-Parameter -Logistik, Logit-log, o.ä.) und ausgedruckt oder
- manuell ausgewertet: Die Mittelwerte der Absorption der Doppelwerte berechnen. Konzentration der Standards (Abszisse) gegen die Lichtemission (Ordinate) auftragen. Für die Patientenproben werden die Werte an der Standardkurve abgelesen.

Validierung

Die mitbestimmten Kontrollen sollten im folgenden Vertrauensbereich liegen:

|                     |   |                       |
|---------------------|---|-----------------------|
| <b>Kontrolle 1:</b> | → | <b>50 - 75 ng/g</b>   |
| <b>Kontrolle 2:</b> | → | <b>200 - 300 ng/g</b> |

**Bestimmung von IgE im Stuhl mittels eines Immunochemoluminometrischen Nachweisverfahrens (ILMA)**

Nur zu wissenschaftlichen Zwecken



Einführung

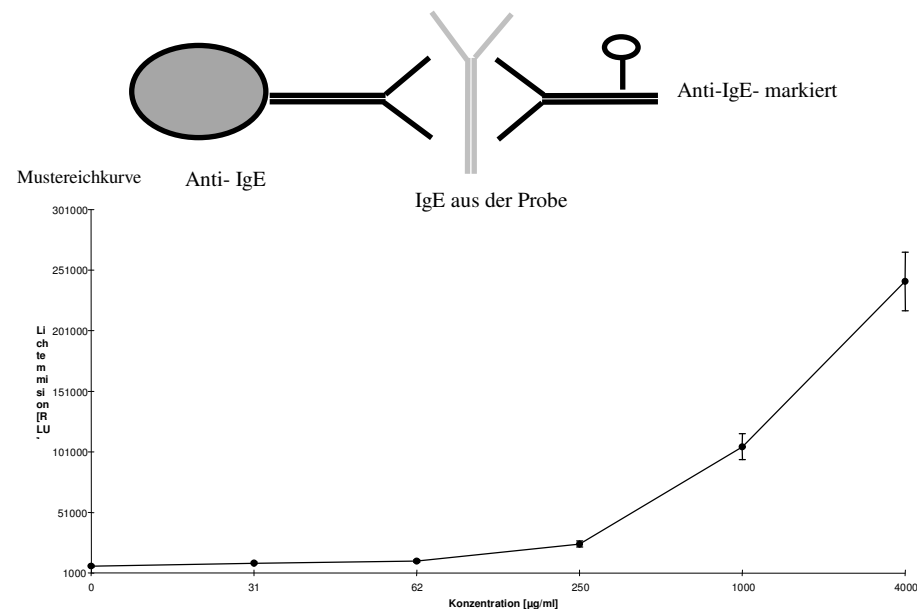
IgE ist ein Glykoprotein, bestehend aus 14% Carbohydrat mit einem Molekulargewicht von 188000 D. Es besteht aus zwei schweren Ketten (e), mit fünf Domänen, und zwei leichten Ketten(k oder l). Die Konzentration von IgE im Serum korreliert mit verschiedenen atopischen Krankheiten, parasitärem Befall und Schwächen des Immunsystems. Die Bestimmung von Gesamt-IgE im Serum findet große Akzeptanz in der Diagnostik dieser Krankheiten und in deren Verlaufskontrolle bei Behandlung. Zur Vorbeugung allergischer Krankheiten bei Kleinkindern ist der Nachweis von IgE sehr wichtig.

Vorteile

- Ein Screening ist durch diese Methode möglich.
- Es kann sowohl Serum als auch Stuhlverdünnung gemessen werden.

Testprinzip / Reaktionsprinzip der Methode

Ein polyklonaler Antikörper gegen IgE ist an die Polystyrolkugel gebunden. Die zu bestimmende Probe und ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen IgE ist, werden in die Röhrchen pipettiert. Während der Inkubationszeit wird IgE sowohl von den fixierten polyklonalen, als auch von den freien monoklonalen Antikörpern gebunden. So entsteht ein Antikörper-IgE-Komplex, der an der Röhrchenwand haftet. Ungebundenes Material wird gewaschen. und die Lichtreaktion durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NaOH in einem Luminometer gestartet und die Lichausbeute mit einem Photomultiplier detektiert. Die Lichtintensität ist proportional zu der Menge spezifischer Antikörper in den Röhrchen.



**Assay Parameter**

|                       |                          |
|-----------------------|--------------------------|
| Antigen an der Kugel: | Kaninchen-Anti-human-IgE |
| 2. Antikörper         | Kaninchen-Anti-human-IgE |
| Probenmaterial:       | Stuhl 1/10 in PPGNE      |
| Probenvolumen         | 100 µl                   |
| Meßbereich:           | 60 - 4000 ng/g           |
| <b>Normbereich</b>    | <b>&lt; 100 ng/g</b>     |

**Zusammensetzung der Testkits**

| Menge   |             | Artikel   |
|---|-------------|---|
| gebrauchsfertig                               | 100 Stk     | <b>100 Kugeln</b><br>(die mit polyklonalen Antikörpern beschichtet sind. In einem proteinhaltigen Lagerungspuffer)      |
| gebrauchsfertig                               | 6 * 1000 µl | <b>6 Standards</b><br>(in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)   |
| gebrauchsfertig                               | 2 * 1000 µl | <b>Kontrollen Level 1 und 2</b><br>(in wäßriger Lösung mit Natriumazid.)  |
| gebrauchsfertig                               | 21 ml       | <b>Tracer</b><br>(Akridiniumester markierter monoklonaler Antikörper in proteinhaltigem Phosphatpuffer mit Natriumazid) |
| in 470 ml heißem entionisiertem Wasser lösen. | 30 ml       | <b>Konzentrat für den Probenverdünnungspuffer</b><br>(Phosphatpuffer mit Natriumazid und Proteinzusatz pH 7,4)          |

**Aufbewahrung der Testkomponenten**

Der gesamte Kit wird in tiefgefrorenem Zustand gelagert. Assaypuffer, Kugeln und Probenverdünnungspuffer können auch im Kühlschrank gelagert werden.

**Probenmaterial und Probenhaltbarkeit**

Die Stuhlproben werden vor der Bestimmung extrahiert und verdünnt. Die Haltbarkeit der Proben beträgt 5 Tage bei 4 °C oder 12 Monate in tiefgefrorenem Zustand.

**Verwendete Geräte und Materialien**

- 100 Einwegröhrchen (12\*75 von Saarestedt)
- Probenständer und Ständer für Saarsredt-Röhrchen.
- Meßzylinder (500 ml)
- 100 µl Pipette
- Multipette mit 5 ml und 50 ml Aufsatz
- Vortex-Mixer
- Luminometer
- Automatisches Waschgerät oder Handwaschgerät oder Wasserstrahlpumpe zum Absaugen der Lösung

**Methodendurchführung**

| Vorbereitungen für die Methodendurchführung |   |
|---|---|
| <b>1</b>                                    | <b>Verdünnungsmedium:</b> Der gesamte Inhalt des Probenverdünnungskonzentrats wird mit 470 ml heißem entionisiertem Wasser aufgefüllt und gut gemischt  |
| <b>2</b>                                    | <b>Kit-Komponenten und Probenmaterial auftauen.</b><br>Die schonendste Möglichkeit besteht darin, den Kit, bzw. die Proben einen Tag vor Gebrauch vom Gefrierfach in den Kühlschrank zu stellen.  |
| <b>3</b>                                    | <b>Vorbereitung der Stuhlproben:</b> Stuhlproben werden eingewogen und 1 / 10 (Gewicht zu Volumen) mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt (Zu 1,0 g Stuhl werden 9 ml Puffer zugegeben). Die Proben werden so lange gemischt bis die Lösung homogen ist. Die Röhrchen werden 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wird im Assay direkt eingesetzt |
| <b>4</b>                                    | <b>Kugeln vor Gebrauch mit entionisiertem Wasser waschen.</b>   |
| <b>5</b>                                    | Die für den Testansatz benötigten Stuhltracks eindeutig beschriften.<br><b>Verwendete Gefäße:</b> Der Testansatz erfolgt in Plastikröhrchen (12*75) in speziellen Ständern  |

**Pipettierschema (für manuelles Pipettieren oder Pipettieren mit einem Probenverteilssystem)**

| Stuhltrack-röhrchen-Nr. |                 | Volumen |
|-------------------------|-----------------|---------|
| 1, 2                    | Standard 0      | 100 µl  |
| 3, 4                    | Standard 1      | 100 µl  |
| 5, 6                    | Standard 2      | 100 µl  |
| 7, 8                    | Standard 3      | 100 µl  |
| 9, 10                   | Standard 4      | 100 µl  |
| 11, 12                  | Standard 5      | 100 µl  |
| 13, 14                  | Kontrolle I     | 100 µl  |
| 15, 16                  | Kontrolle II    | 100 µl  |
| 17, 18                  | Proben          | 100 µl  |
| alle 25 Proben          | Kontrolle I, II | 100 µl  |
| am Ende der Serie       | Kontrolle I, II | 100 µl  |

**Allgemeine Hinweise**

- Dieser Testkit und alle darin enthaltenen Komponenten dürfen nur zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt zur in vitro-Diagnostik verwendet werden.
- Alle Testkomponenten sollten immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Alle mitgelieferten Testkomponenten enthalten Natriumazid. Bitte alle Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Die Berührung mit der Haut sollte vermieden werden.
- Es sollte unter keinen Umständen mit dem Mund pipettiert werden. Während der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen.
- Reagenzien aus unterschiedlichen Kit-Chargen dürfen nicht verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinischen Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Der Hersteller 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 zu übersenden.
- Der Testkit ist nach Ablauf des auf die Packung aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.
- Nach dem Öffnen der Packung ist der Testkit mit Lagerung im Kühlschrank noch bis zum aufgedruckten Verfallsdatum zu verwenden.