

ИНСТРУКЦИЯ

Тест-система для количественного определения аллерген-специфических IgG в сыворотке или плазме человека с применением аллергенов нанесенных в лунки ломких стрипов

Лабораторный иммунологический метод (ELISA)

для диагностики *in vitro*

Регистрационное удостоверение № ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015 г.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Тел.: +7 (495) 799-1165

E-mail: info@fooke.ru

www.fooke.ru

Внимание! Перевод сделан с английского оригинала полной версии инструкции по применению. Фирма изготовитель может, вкладывать в набор многоязычный вариант инструкции.

ВВЕДЕНИЕ

Антитела, также известные как иммуноглобулины (Ig), играют важную роль в гуморальном иммунном ответе на внешние возбудители инфекционных заболеваний. Кроме того, иммуноглобулины и, в частности, иммуноглобулины класса IgG могут появляться в случае безвредных в норме антигенов, например, вдыхаемых антигенов или пищевых антигенов. Обычно заболевание представляет собой экзогенные аллергические альвеолиты, которые могут быть вызваны воздействием веществ, содержащихся в воздухе на рабочем месте. Обычно это плесневые или бактериальные компоненты, но также это могут быть и экскременты, тонкодисперсные порошки или химические компоненты, которые вдыхаются в форме пыли или аэрозолей во время работы. Болезнь, известную как легкое фермера, вызывают термофильные актиномицеты, присутствующие в плесневелом сене. Заболевания такого рода представлены болезнью легкого фермера, болезнью легкого солодолопатчика и болезнью работающих с древесной массой, а также аллергозом голубевоодов. Кроме того, известно, что рыбная мука, опилки, меховая пыль и химические компоненты тоже могут вызывать альвеолит.

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест на специфические IgG методом твердофазного иммуноферментного анализа (IgG-ELISA) предназначен для количественного определения специфических IgG к вдыхаемым антигенам в сыворотке и плазме человека и помогает диагностировать так называемые реакции III типа со стороны легких (например, легкое фермера, легкое солодолопатчика, болезнь работающих с древесной массой и аллергоз птицеводов).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест на специфические IgG (sIgG) основан на методе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Он позволяет обнаруживать специфические IgG у пациентов с аллергиями III типа (экзогенные аллергические альвеолиты). Разведенные образцы сыворотки или плазмы пациентов инкубируют в стрипах с микролунками, на которые нанесены антигены. Во время инкубации специфические IgG связываются с антигенами, нанесенными на поверхность микролунок. После нанесения конъюгата антител к IgG человека с щелочной фосфатазой образуется комплекс антиген/IgG/конъюгат антител к IgG человека с щелочной фосфатазой. После внесения раствора р-нитрофенил-фосфата (pNPP) проводят количественное определение комплекса антител с ферментом. После добавления натрия гидроксида (NaOH) экстинкция окрашенного продукта реакции, пропорциональная количеству специфических IgG в образце, может быть измерена на длине волны 405 нм (референсная длина волны 620 нм). Калибровочные стандарты с известными концентрациями IgG используют для получения калибровочной кривой, по которой можно определять концентрации IgG.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Компоненты набора	10100PG
Конъюгат антител к IgG с ферментом	1 x 10 мл
Концентрат промывочного буфера С 50x	1 x 30 мл
Буфер для разведения	1 x 100 мл
Субстратный буфер	1 x 25 мл
Таблетки суб-страта (pNPP)	5 x 5 мг
Стоп-раствор (1 N NaOH)	1 x 10 мл

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

Набор калибраторов	12001PG
Референсные стрипы	6 x 8 ячеек
Калибраторы (0.25, 0.83, 2.5, 8.3, 25 мкг/мл)	5 x 1.0 мл
Положительный контроль	1 x 1.0 мл
Отрицательный контроль	1 x 1.0 мл
Стрипы, разъединяющиеся на ячейки, с иммобилизованными в лунках аллергенами	Код аллергена + G

НЕОБХОДИМОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Пипетки на 10-100 мкл, 200-1000 мкл, многоканальная пипетка, наконечники, пробирки для разбавления образцов, мерный цилиндр, микропланшетный фотометр, инкубатор, плёнка для закрытия ячеек. Дополнительно: микропланшетный вошер (устройство для промывания микропланшетов).

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного анализа можно использовать сыворотку или плазму пациента. Для сохранения целостности образца никакие добавки или консерванты не требуются.

При температуре 2-8°C образцы стабильны в течение 48 часов после взятия образцов. При невозможности провести анализ в течение 48 часов или если нужна транспортировка образца, образец необходимо закрыть и заморозить. Следует избегать повторного замораживания и размораживания. Замороженные образцы следует размораживать при комнатной температуре (комнатная температура, 20-25°C) и, аккуратно переворачивая, тщательно перемешивать перед анализом. Не рекомендуется использовать гемолизированные или липемические образцы.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Неиспользуемые микротитровальные стрипы нужно надлежащим образом повторно герметично упаковать в имеющийся пакет из фольги с осушителем.

Прежде чем использовать все реагенты, обеспечьте достижение ими комнатной температуры.

Конъюгат:	готов к применению
Калибровочные стандарты и контроли:	готовы к применению
Буфер для разведения:	готов к применению
Стоп-раствор:	готов к применению

Раствор субстрата:

Для 20 определений растворите одну таблетку субстрата в 5 мл субстратного буфера приблизительно за один час до использования, и храните в темном месте.

Промывочный раствор:

Концентрированный промывочный буфер необходимо развести водой высокой степени очистки в соотношении 1:50. (Например, для 2 стрипов нужно 10 мл промывочного раствора. Поэтому 200 мкл концентрированного промывочного буфера нужно развести водой высокой степени очистки до получения конечного объема 10 мл). Полученный таким образом промывочный буфер стабилен в течение одной недели при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Подготовьте протокол для проведения анализа. Калибровочные стандарты и контроли рекомендуется анализировать в двух повторностях.
2. Разведите образцы пациентов в соотношении 1:101, используя для этой цели буфер для разведения (10 мкл сыворотки + 1 мл буфера для разведения).
3. Поместите нужные лунки с нанесенным покрытием в рамку и снова надлежащим образом герметично закройте пакет из алюминия с оставшимися стрипами и осушителем.

4. С помощью пипетки перенесите ровно 100 мкл калибровочных стандартов, контролей и образцов пациентов в соответствующие, предназначенные для них лунки.
5. Накройте планшет и инкубируйте один час при 37°C.
6. Промойте планшет вручную или используйте для этой цели подходящее устройство для промывания планшетов для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), промывать необходимо 3 раза, каждый раз используя 300 мкл на лунку. Удалите остатки жидкости, выстучав микропланшет на бумажное полотенце.
7. С помощью пипетки перенесите ровно 100 мкл конъюгата с антителами к IgG в каждую лунку, накройте планшет и инкубируйте один час при 37°C.
8. Повторите процедуру промывания, как описано в пункте 6.
9. С помощью пипетки внесите 200 мкл раствора субстрата (p-нитрофенил-фосфат в субстратном буфере) в каждую лунку, накройте и инкубируйте 30 минут в темноте при 37°C.
10. С помощью пипетки в каждую лунку внесите 50 мкл стоп-раствора в том же порядке, что и субстрат.
11. Инкубируйте 5 минут при комнатной температуре и оставьте раствор гомогенизироваться.
12. На длине волны 405 нм измерьте значения оптической плотности (референсная длина волны 620 нм), используя соответствующий микропланшетный ридер, обслуживание которого осуществляется регулярно.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА



ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для вычисления результатов рекомендуется использовать прошедшее валидацию программное обеспечение. Для вычисления вручную, по данным, полученным при анализе калибровочных стандартов и контролей, вычисляют средние значения оптической плотности (ОП) (Δ 450 нм - 620 нм). По средним значениям ОП пяти калибровочных стандартов строят график на полулогарифмической бумаге (абсцисса: \log Ед. IgG /мл; ордината: линейная ОП Δ 450 нм - 620 нм) для полу-

получения стандартной кривой. Концентрацию sIgG в образце пациента определяют на основе этой стандартной кривой. Значение ОП откладывают по оси ординат, результат в мкг/мл можно прочитать по оси абсцисс. Стандартная кривая и контроли должны соответствовать диапазону приемлемых значений, указанных в Сертификатах контроля качества, которые поставляются вместе с набором. В противном случае необходимо проверить условия проведения анализа и, вероятно, повторить анализ.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По калибровочной кривой рассчитывают концентрации sIgG в образцах, выражая их как классы или в международных единицах на мл (мгк/мл), и оценивают следующим образом:

slgG мкг/мл	Интерпретация
< 1,0	отрицательный
1,0 – 2,0	неопределенный
> 2,0 – 3,5	положительный
> 3,5	высоко положительный

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая важность положительного результата анализа значительно варьирует в зависимости от конкретных антигенов. Поэтому рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно определяла ожидаемые значения для конкретных популяций за определенный период времени посредством статистически значимого количества анализов, прежде чем результаты анализа приобретут клиническую значимость. Указанные выше значения можно использовать в качестве ориентира для получения собственных результатов.

АЛЛЕРГЕНЫ С КОНТРОЛЬНЫМ СТРИПОМ HSA

Низкомолекулярные вещества (гаптены), например, пенициллин и изоцианаты, на микротитровальных стрипах иммобилизованы белком (человеческий сывороточный альбумин/HSA). В редких случаях образцы пациентов могут содержать специфические IgG к HSA. Поэтому для каждого образца пациента необходимо проверять реакцию на сам HSA посредством анализа лунки с HSA-контролем и сравнения результатов с конъюгатом антигена с HSA.

Рекомендуемая интерпретация:

Концентрацию специфического IgG в присутствии конъюгата с HSA измеряют параллельно с определением специфических IgG к HSA. Концентрацию специфических IgG к HSA следует вычесть из концентрации, полученной при анализе соответствующего конъюгата с HSA.

Альтернативная интерпретация:

Результат определения конъюгата антигена с HSA вычисляют путем умножения значения оптической плотности (ОП) стрипа с HSA-контролем на 2.

$$\text{Пороговое значение} = \text{ОП (стрип с HSA-контролем)} \times 2$$

ОП конъюгата антигена с HSA > Пороговое значение: положительный результат.

ТОЧНОСТЬ (Прецизионность)

Вариабельность и воспроизводимость

1. в пределах одной серии анализов

2. между сериями анализов

Образец	Значение мкг/мл	Коэффициент вариации (%)	Образец	Значение мкг/мл	Коэффициент вариации (%)
1 (n=10)	178	5.8	1 (n=20)	161	13.5
2 (n=10)	53	6.6	1 (n=20)	58	10.5
3 (n=10)	237	7.0	1 (n=20)	239	7.7

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Концентрация, калибровочный стандарт (мкг/мл)	Среднее значение ОП 405 нм	Диапазон значение ОП 405 нм
0,25	0,173	0,200 ± 0,100
0,83	0,298	0,300 ± 0,100
2,5	0,661	0,750 ± 0,150
8,3	1,774	1,800 ± 0,300
25	2,820	3,000 ± 0,500

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- В соответствии со статьей 1, параграф 2b, Европейской директивы 98/79/ЕС, для использования медицинских изделий для диагностики in-vitro производителем предусмотрено обеспечение пригодности, технических характеристик и безопасности продукта. Поэтому необходимо строго следовать процедуре анализа, информации, особым указаниям и мерам предосторожности, изложенным в инструкциях по применению. Набор необходимо использовать только в соответствии с описанием, представленным на странице 1 (предназначение).
- Тест необходимо проводить в соответствии с данной инструкцией, в которой представлена вся необходимая информация, а также особые указания и меры предосторожности. Необходимо подвергнуть проверке использование наборов для анализа вместе с анализаторами или аналогичным оборудованием. Никакие изменения конструкции, состава или процедуры анализа, равно как и использование в сочетаниях с другими продуктами, не одобренными производителями, не разрешены; за такие изменения, которые могут привести к ложным результатам и другим инцидентам, ответственность несет сам пользователь. Производитель не несет ответственности за любые результаты визуального анализа образцов пациентов.
- Набор предназначен для использования только обученными и квалифицированными специалистами, проводящими исследования или осуществляющими диагностику. Беременные женщины не должны проводить данный анализ.
- Лабораторное оборудование следует содержать в соответствии с инструкциями производителя, перед применением необходимо проверить правильность его работы.
- Только для диагностического применения in-vitro. Только для однократного применения. Не используйте компоненты с истекшим сроком годности. Не сочетайте с данным набором реагенты других поставщиков или компоненты наборов из других партий (если только на странице 1 не указано иное).
- Не используйте компоненты набора, если упаковка компонента повреждена. Пожалуйста, прежде чем использовать, проверьте все растворы на предмет микробного загрязнения. Сразу же после использования плотно закрывайте флаконы, чтобы избежать испарения и микробного загрязнения. Не меняйте завинчивающиеся крышки флаконов с реагентами.
- Набор прошел оценку для использования при температурах, указанных в Схеме проведения анализа (смотрите страницу 2). Более высокие или более низкие температуры могут привести к получению значений, не соответствующих диапазонам контроля качества.
- Процедура промывания безусловно важна. Неправильное промывание станет причиной ошибочных результатов. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку и автоматическое устройство для промывки.
- Чтобы избежать перекрестного загрязнения и ложноположительных результатов рекомендуется проводить все этапы пипетирования надлежащим образом. Используйте только чистые наконечники для пипеток, дозаторы и лабораторную посуду.
- Диагностические компоненты, полученные на основе сыворотки крови человека, были протестированы методом с маркировкой SE на антитела к ВИЧ 1/ВИЧ 2, антитела к ядерному антигену вируса гепатита В, антитела к вирусу гепатита С и поверхностный антиген вируса гепатита В, и были признаны отрицательными. Тем не менее, с материалами на основе сыворотки крови человека, следует обращаться как с потенциально инфицированными (БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ).
- Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин, который, по данным производителя, не несет в себе никакой известной возможности инфицирования. Поскольку иногда могут встречаться неподдающиеся обнаружению возбудители инфекции, мы рекомендуем обращаться с любым продуктом животного происхождения как с потенциально заразным.
- В отношении всех реагентов необходимо соблюдать следующие правила безопасности:
 - Не допускать попадания в глаза, на кожу или на одежду (P262). Не вдыхать спрей (P260). Никогда не следует осуществлять пипетирование с помощью рта, всегда необходимо использовать подходящие устройства для пипетирования.
 - В СЛУЧАЕ ПРОГЛАТЫВАНИЯ: прополоскать рот. НЕ вызывать рвоту (P301/330/331)
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ НА КОЖУ (или на волосы): Сразу же удалить/снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой/душем (P303/361/353).
 - В СЛУЧАЕ ВДЫХАНИЯ: Вывести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить покой в положении, удобном для дыхания (P303/340).
 - В СЛУЧАЕ ПОПАДАНИЯ В ГЛАЗА: Осторожно промывать водой в течение нескольких минут. Если есть контактные линзы, снять их, если это не сложно. Продолжить промывание глаз. (P305/351/338)
 - Во время проведения анализа нельзя есть, пить и курить. Нельзя держать поблизости продукты питания, корма и напитки.
 - Необходимо надевать защитные перчатки/защитную одежду/средства для защиты глаз (P280). Следует тщательно мыть руки после обращения с продуктом (P264) и обеспечить уход за кожей.
 - По запросу может быть предоставлен паспорт безопасности вещества.
- Стоп-раствор вызывает тяжелые ожоги кожи и травмы глаз (H314).
- ТМБ в высоких концентрациях может быть потенциально мутагенным. В связи с низкой концентрацией ТМБ в данном растворе субстрата мутагенный эффект можно исключить, при условии надлежащего способа применения.
- Консерванты (Бронидокс, Тимеросал, Азид) токсичны для водных организмов, но их концентрация не опасна для окружающей среды. При утилизации большие объемы реагентов следует смывать большим количеством воды. Тимеросал (Промывочный буфер В) может вызывать поражение органов при длительном или многократном воздействии (H373).
- Отходы, в составе которых присутствует сыворотка, следует собирать в отдельные контейнеры, содержащие надлежащее дезинфицирующее средство в достаточной концентрации. С данным веществом следует обращаться в соответствии с национальными руководствами или нормативами, касающимися биологической опасности и безопасности.
- Настоящим отсылаем вас к национальным нормативам по медицинским изделиям, касающимся наборов для анализов, предназначенных для in-vitro диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

См. инструкцию на английском языке.

REF 10100PG Σ 96 Determinations

BACKGROUND

Antibodies, also known as immunoglobulins (Ig), play an important role in the humoral immune response to extrinsic, infectious agents. Furthermore Ig and in particular Ig of the IgG type can be generated to normally harmless antigens, e.g. inhalation antigens or food antigens. A typical disease represents the exogenous allergic alveolitis (EAA), which can be caused by occupational exposition of substances in the air. Involved are normally mouldy-and bacterial components but also excrements, flours or chemical components which are inhaled as dusts or aerosols during work. Farmers lung is caused by Thermophile Actinomyces in mouldy hay. Farmers lung, Malt-and Paper workers lung as well as Pigeon Breeders disease are well known to represent such diseases. Also fish flour, saw dust, dust from furs and in addition chemical components can cause Alveolitis.

INTENDED USE

The Specific IgG - ELISA is intended for the quantitative determination of specific IgG in human serum and plasma against inhalation antigens and help to diagnose so called Type III reactions of the lung (e.g. Farmers lung, Malt and Paper workers lung and Bird fanciers disease).

PRINCIPLE

This sIgG test is based on ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) technology. It detects specific IgG of patients with Type III allergies (exogenous allergic alveolitis). Diluted serum or plasma samples of patients are incubated in antigen coated microwell strips. During incubation specific IgG binds to antigens on the surface of the microwell cavity. After application of anti-human-IgG-alkaline-phosphatase (AP) conjugate a complex of anti-gen/IgG/anti-IgG-AP will form. After application of p-nitrophenyl-phosphate (pNPP) solution the amount of antibody-enzyme complex is detected. After addition of sodium hydroxide (NaOH) the extinction of the coloured reaction product which is proportional to the amount of specific IgG of the sample, can be measured at 405 nm (reference wave length 620 nm). Calibrators of known IgG concentrations form a calibration curve in which the IgG concentrations of the samples can be determined.

KIT COMPONENTS

Component	10100PG
Anti-IgG-Enzyme Conjugate	1 x 10 mL
Washing Buffer Concentrate C	1 x 30 mL
Dilution Buffer	1 x 100 mL
Substrate Buffer	1 x 25 mL
Substrate Tablets (pNPP)	5 pieces
Stop Solution (1 N NaOH)	1 x 10 mL

MATERIAL NEEDED BUT NOT INCLUDED IN THIS KIT

Reference unit	12001PG
Reference wells	6 x 8 wells
Calibrators (0.25; 0.83; 2.5; 8.3; 25 U/mL)	5 x 1.0 mL
Control high	1 x 1.0 mL
Control low	1 x 1.0 mL
Antigen-coated strips	13-code-G

OTHERS

Pipettes: 10-100 µL, 200-1000 µL, Multipette, pipette tips, tubes for dilution of the specimens, micro plate-reader, incubator, covering foil, lab watch. Optionally: micro plate-washer

SPECIMEN COLLECTION & PREPARATION

Either Serum or Plasma can be used in this test. No additives or preservatives are necessary to maintain the integrity of the specimen.

Specimens should be stored at 2-8°C and assayed within 48 hours after collection. If the assay cannot be performed within 48 hours or if the specimen has to be shipped, cap the specimen and keep it frozen. Repeated freezing and thawing should be avoided. Frozen specimens should be thawed at room temperature (RT, 20-25°C) and mixed thoroughly by gentle inversion before assaying. The use of haemolysed or lipemic specimens is not recommended.

PREPARATION OF REAGENTS

Microtiterstrips which are not required have to be re-sealed properly in the provided foil bag containing a desiccant.

Allow all reagents to come to RT before use.

- Conjugate:** ready to use
- Calibrators and Controls:** ready to use
- Dilution Buffer:** ready to use
- Stop Solution:** ready to use

Substrate Solution:

For 20 determinations dissolve one Substrate Tablet in 5 mL Substrate Buffer about one hour before use and store in the dark.

Wash Solution:

The concentrated Washing Buffer has to be diluted 1:50 in aqua bidest. (Example: For 2 strips 10 mL of Washing Buffer is required. Therefore 200 µL concentrated Washing Buffer have to be diluted to a final volume of 10 mL with aqua bidest.). The resulting Washing Buffer is stable for one week at RT.

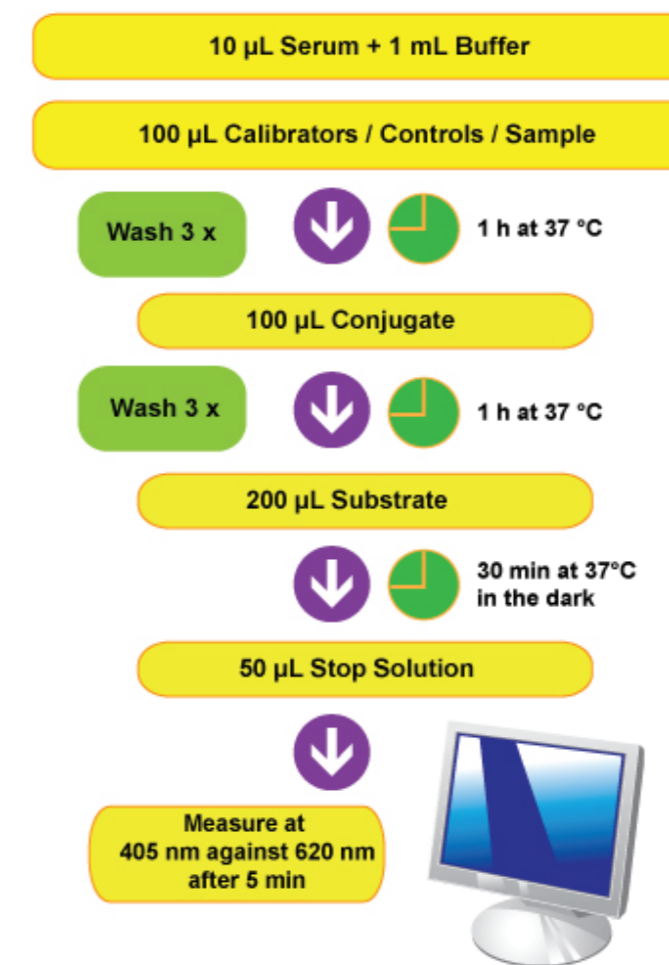
ASSAY PROCEDURE

1. Prepare a protocol for the assay run. It is recommended to test the Calibrators and Controls in duplicate determination.
2. Dilute patient samples 1:101 with Dilution Buffer (10 µL serum + 1 mL Dilution Buffer).
3. Place the required coated wells into a frame and reseal the aluminium bag with the remaining strips and desiccant properly.
4. Pipette exactly 100 µL calibrators, controls and patient samples into their respective wells.
5. Cover plate and incubate for one hour at 37 °C.
6. Wash the plate manually or with an appropriate ELISA plate washer 3 times each with 300 µL Washing Buffer per well. Remove residual liquid by dunking the microplate onto a paper towel.
7. Pipette exactly 100 µL anti-IgG conjugate in each well and cover the plate and incubate for one hour at 37 °C.
8. Repeat washing as described in step 6.
9. Pipette 200 µL Substrate Solution (pNPP in Substrate Buffer) to each well, cover and incubate for 30 min at 37 °C in the dark.
10. Pipette 50 µL of Stop Solution in the same order as the substrate to each well.
11. Incubate for 5 min at RT to let the solution homogenize.
12. Read OD at 405 nm (reference wave length 620 nm) using an appropriate microplate reader which is maintained regularly.

CALCULATION OF RESULTS

It is recommended to use validated software for the calculation of the results. For manual calculation, the mean OD [Δ 405 nm – 620 nm] values are calculated from the Calibrators and Controls. Generate a graph from the mean OD values of the five Calibrators on half logarithmic paper (Abscissa: log U IgG/mL; Ordinate: linear OD Δ 405 nm – 620 nm) to create a standard curve. The sIgG concentration of the patient sample is determined on the basis of this standard curve. The OD is mapped on the Ordinate and the result in U/mL can be read out on the Abscissa. The standard curve and the controls should be in the acceptance range given in the Quality-Control-Certificates delivered with the kit. Otherwise, the test conditions should be verified and the test should be repeated probably.

TEST SCHEME Specific IgG - ELISA



EXAMPLE CALIBRATOR CURVE

Calibrator-Concentrations (U/mL)	Mean OD 405 nm	Range OD 405 nm
0.25	0.173	0.200 ± 0.100
0.83	0.298	0.300 ± 0.100
2.5	0.661	0.750 ± 0.150
8.3	1.774	1.800 ± 0.300
25	2.820	3.000 ± 0.500
100,0	3,015	2,111 - 3,920

MEASURING RANGE

This ELISA detects IgG concentrations between 0.25 U/mL and 25 U/mL. Specimens with higher IgG concentrations should be diluted and retested to determine the exact IgG content.

Interpretation of results:

spec. IgG (U/mL)	Interpretation
< 1.0	negative
1.0 – 2.0	indefinite
> 2.0 – 3.5	positive
> 3.5	strong positive

RESULTS TO BE EXPECTED

The clinical relevance of a positive test report varies significantly between individual antigens. Therefore, it is recommended, that expected values for given populations should be determined by each laboratory over a period of time and in a statistically significant number of assays before clinical significance is attached to the results of the assay. The values given above can be used as a guideline for the own results.

ALLERGEN WELLS WITH CONTROL WELLS (HSA)

Low molecular substances (Haptens) e.g. Penicillin and Isocyanates, are coupled to the microtiterstrips by a protein (Human Serum Albumin / HSA). In rare cases patient samples can contain HSA specific IgG. Therefore reaction against HSA itself has to be tested for each patient sample by running the HSA-Control well test and comparing the results to the Antigen-HSA-Conjugate.

Recommended interpretation:

The sIgG concentration against the HSA conjugate is measured in parallel to sIgG to HSA. The sIgG concentration to HSA has to be subtracted from the concentration obtained from the respective HSA conjugate.

Alternative interpretation:

The result for the Antigen-HSA-Conjugate is calculated by multiplying the OD-Value of the HSA Control Disc by the factor 2.

$$\text{Cut off} = \text{OD (HSA control disc)} \times 2$$

OD Antigen-HSA-Conjugate > Cut off: positive result.

PRECISION

Variability and Reproducibility

1. Intra-Assay Variability			2. Inter-Assay Variability		
Specimen	U/mL	CV (%)	Specimen	U/mL	CV (%)
1 (n=10)	178	5.8	1 (n=20)	161	13.5
2 (n=10)	53	6.6	1 (n=20)	58	10.5
3 (n=10)	237	7.0	1 (n=20)	239	7.7

PRECAUTIONS FOR USERS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of in-vitro diagnostic medical devices is intended to secure suitability, performance and safety of the product by the manufacturer. Therefore the test procedure, information, precautions and warnings stated in the instructions for use have to be followed strictly. The kit has only to be used as described on page 7 (intended use).
- The test must be performed according to this instruction, which contains all necessary information, precautions and warnings. The use of the test kit with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition of the test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes resulting in false results and other incidents. The manufacturer is not liable for any results obtained by visual analysis of patient samples.
- The kit is intended for use by trained and qualified professionals carrying out research or diagnostic activities only. Pregnant women should not perform the test.
- Laboratory equipment has to be maintained according to the manufacturer's instructions and must be tested for its correct function before use.
- For in-vitro diagnostic use only. Use only once. Do not use components exceeding the expiry date. Do not combine reagents of other suppliers or kit components of different lots (unless specified on page 7) with this kit.
- Do not use kit components when the package of the component is damaged. Please check all solutions prior to use for microbiological contamination. Cap vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbiological contamination. Do not interchange screw caps of the reagent vials.
- The kit was evaluated for use at the temperatures specified in the Testing scheme (see page 9). Higher or lower temperatures may result in values not meeting the quality control ranges.

- The washing procedure is absolutely important. Improper washing will cause erroneous results. It is recommended to use a multichannel pipette and an automated washer.
- To avoid cross-contamination and false-positive results it is recommended to perform all pipetting steps properly. Use only clean pipette tips, dispensers and lab ware.
- Test components based on human serum were tested using a CE marked method for the presence of antibodies against HIV 1 / HIV 2, Anti-HBc, and Anti-HCV as well as for hepatitis anti-gen HBsAg and were found to be negative. Nevertheless, material based on human serum should be handled as potentially infectious (BIOHAZARD).
- Some kit components may contain bovine serum albumin, of which according to the manufacturer no infectious potential is known. Due to the eventual occurrence of undetectable infectious agents we recommend to handle any product of animal origin as potentially infectious.
- The following safety rules should be followed with all reagents:
 - Do not get in eyes, on skin, or on clothing (P262). Do not breathe spray (P260). Pipetting should never be done by mouth, but with suitable pipetting devices.
 - IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting (P301/330/331)
 - IF ON SKIN (or hair): Remove/Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower (P303/361/353).
 - IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing (P303/340).
 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. (P305/351/338)
 - Don't eat, drink or smoke while performing the test. Keep away from food, feed and beverage.
 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection (P280). Wash hands thoroughly after handling (P264) and care for your skin.
 - Material safety data sheet is available on request.
- Stop Solution and SubBuf cause severe skin burns and eye damage (H314).
- TMB in high concentrations may be potentially mutagenic. Due to the low concentration of TMB in this substrate solution a mutagenic effect can be ruled out, if it is properly used.
- p-NPP is harmful if swallowed (H302). Diethanolamin (SubBuf) may cause damage to organs through prolonged or repeated exposure (H373). Get medical advice/attention if you feel unwell (P314).
- The preservatives (Bronidox) are toxic to aquatic life, but their concentration is not hazardous to environment anymore. On disposal, flush large volumes of reagents with plenty of water.
- Waste containing serum must be collected in separate containers containing an appropriate disinfectant in sufficient concentration. This material has to be treated according to national biohazard and safety guidelines or regulations.
- We refer to the national regulations of medical devices regarding in-vitro diagnostic test kits.

LITERATURE

- Garcia et al: Modifications in IgG subclass in the course of immunotherapy with grass pollen. J Invest Allergol Clin Immunol 1993, 3:19-25.
- Hedlin et al: Long-term follow up of patients treated with a three-year course of cat or dog immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1995, 96:79-85.
- Moss RB: IgG Subclass Antibody Markers in Grass pollen Immunotherapy. N Eng Reg Allergy Proc 1987, 8:409-415.
- Nakagawa T: IgG Subclass Antibodies in Response to House Dust Mite Immunotherapy. N Eng Reg Allergy Proc 1987, 8:423-428.

DR. FOOKE
LABORATORIEN GMBH

Тел.: +7 (495) 799-1165
E-mail: info@fooke.ru
www.fooke.ru