



Arbeitsanleitung/Manual

Immunglobulin E ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung des IgE in Serum und Stuhl

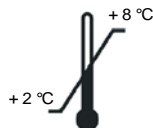
Immunoglobulin E ELISA Kit

For the in vitro determination of IgE in serum and stool

Gültig ab/valid from 28.01.2008



K 6511



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhaltsverzeichnis	Seite/Page
Table of contents	2
1. VERWENDUNGSZWECK	3
2. EINLEITUNG	3
3. TESTPRINZIP	4
4. INHALT DER TESTPACKUNG	4
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
7. HINWEISE UND VORSICHTSMABNAHMEN	6
8. PROBENVORBEREITUNG	6
9. TESTDURCHFÜHRUNG	6
HINWEISE	6
PIPETTIERSCHEMA	7
10. ERGEBNISSE	8
11. EINSCHRÄNKUNGEN	9
12. QUALITÄTSKONTROLLE	9
ERWARTETE ERGEBNISSE	9
13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9

TABLE OF CONTENTS	PAGE
1. INTENDED USE	12
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	12
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. MATERIAL SUPPLIED	13
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	14
7. PRECAUTIONS	15
8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	15
9. ASSAY PROCEDURE	15
PROCEDURAL NOTES	15
TEST PROCEDURE	16
10. RESULTS	17
11. LIMITATIONS	17
12. QUALITY CONTROL	18
EXPECTED VALUES	18
13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	18

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. TESTPRINZIP

Dieser Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) dient zur quantitativen Bestimmung des humanen Immunglobulin E (IgE) aus Serum und Stuhl. 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 von 100 µl des 2. spezifischen Antikörpers, der mit POD markiert ist. Nach nochmaligem Waschen und Substratzugabe erfolgt die Quantifizierung durch Umsetzung des Substrates. Die daraus resultierende Extinktion, die mittels eines ELISA-Photometers bei 450 nm gemessen wird, ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Antigens.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art. Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 6511MTP	PLATE	Mikrotiterplatte, vorbeschichtet	12 x 8
K 6511WB	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	2 x 100 ml
K 6511K	CONJ	Konjugat, (anti IgE, Peroxidase-markiert)	1 x 150 µl
K 6511ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 0.31; 1.25; 5; 20 kU/l)	5 x 1ml
K 6511KO	CTRL	Kontrolle	1 x 1 ml
K 6511PV	SAMPLEBUF	Probenverdünnungspuffer	1 x 50 ml
K 6511TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 6511AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes oder deionisiertes Wasser
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (50 ml WASHBUF + 450 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Die **STD** (Standards) und **CTRL** (Kontrolle) sind gebrauchsfertig und können bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum gelagert werden (siehe Etikett).
- Das **CONJ** (Konjugat, Peroxidase-markiert) wird **1:100** in Waschpuffer verdünnt (100 µl CONJ + 10 ml Waschpuffer). Das **unverdünnte CONJ** (Konjugat, Peroxidase-markiert) ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil. Die **verdünnte Konjugatlösung kann nicht aufbewahrt werden**.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befunden worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter H_2SO_4 . H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch im verdünnten Zustand mit Vorsicht behandelt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.

8. PROBENVORBEREITUNG

Stuhlproben

Ca. **100 mg** Stuhl einwiegen und die genau eingewogene Stuhlmenge notieren und in **5 ml** des Waschpuffers lösen (sehr gut mischen). Danach wird die Suspension für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand ist bei $-20^{\circ}C$ für ca. einen Monat haltbar. **100 µl** des Überstands werden in den Test eingesetzt.

Zur einfacheren Dosierung und Homogenisierung des Probenmaterials empfehlen wir das Probenvorbereitungssystem der Fa. Roche Diagnostics/ Mannheim (Best. Nr. 745804).

Serum

Serumproben werden **1:50** vorverdünnt:

20 µl Serum /Plasma + 980 µl SAMPLEBUF (Probenverdünnungspuffer).

Zur Berechnung der IgE-Konzentration muss der Verdünnungsfaktor mit einkalkuliert werden.

9. TESTDURCHFÜHRUNG

Hinweise

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettiervolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller koordiniert wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.
- Der Assay ist immer, nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung abzuarbeiten.

Pipettierschema

Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte vor Gebrauch **5x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.

Die Bestimmungen sind in der Mikrotiterplatte in Doppelwerten durchzuführen.

1. **100 µl STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **Patientenproben** pro Kavität pipettieren.
2. **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Inhalt der Platte verwerfen und die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
4. **100 µl CONJ** (Konjugat) pro Vertiefung pipettieren.
5. **1 Stunde** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Inhalt der Platte verwerfen, und die Vertiefungen **5 x mit je 250 µl** Waschpuffer waschen.
7. **100 µl SUB** (TMB-Substratlösung) pro Vertiefung pipettieren.
8. **5 - 10 min** bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren, bis ausreichend große Farbdifferenzen eingetreten sind.
9. **50 µl STOP** (Stopplösung) pro Vertiefung pipettieren.
10. Die Extinktion wird **sofort** im Mikrotiterplattenphotometer bei **450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen. Sollte die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigen, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

10. 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. 0.01).

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 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. 0.01).

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.

Stuhlproben

Die ermittelte IgE Konzentration der Stuhlprobe wird wie im folgendem Beispiel berechnet:

Einwaage: 80 mg (1ml Stuhl = 1g) = 0,08 ml

Verdünnungsstufe 1: $5\text{ml} / 0,08\text{ml} = 62,5$

Verdünnungsfaktor: 62,5

Die ermittelte Stuhlkonzentration wird mit **62,5** multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen. **Der Faktor ändert sich mit der Einwaage der Stuhlprobe.**

Serumproben

Die ermittelte Serumkonzentration wird mit **50** multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu bestimmen.

11. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer IgE Konzentration größer dem größten Standard sollten mit dem entsprechenden Puffer weiter verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

12. QUALITÄTSKONTROLLE

Für die Qualitätskontrolle empfehlen wir die Verwendung unabhängiger externer Kontrollen.

Erwartete Ergebnisse

Normwerte:

IgE-Konzentration (Serum): 40-120 kU/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.

- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische 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. 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 zurück zu senden.

28.01.2008 04042002_IgE.DOC

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

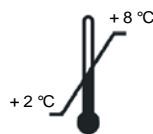
Immunglobulin E ELISA Kit

For the in vitro determination of IgE in serum and stool

Valid from 28.01.2008



K 6511



1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Assay is intended for the quantitative determination of IgE in serum and stool. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Immunoglobulin E (IgE) has been demonstrated in several human secretions and fluids, such as respiratory tract mucus 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 sensitized 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-sensitization and atopic reaction. In patients suffering from allergy, the IgE levels increase as much as three to four times compared to the healthy.

Indication

- 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. PRINCIPLE OF THE TEST

In a first incubation step, the **IgE** in the samples is bound to polyclonal antibodies (in excess), which are immobilized 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-labeled 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 color converts from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of **IgE** in the sample. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD) vs. concentration is generated, using results obtained from the calibrators. **IgE**, present in the patient samples, is determined directly from this curve.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 6511MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8
K 6511WB	WASHBUF	ELISA wash concentrate 10x	2 x 100 ml
K 6511K	CONJ	Conjugate, (anti-IgE, Peroxidase-labeled)	1 x 150 µl
K 6511ST	STD	Standards, ready to use (0; 0.31; 1.25; 5; 20 kU/l)	5 x 1ml
K 6511KO	CTRL	Control, lyophilized	1 ml
K 6511PV	SAMPLEBUF	Sample dilution buffer	2 x 50 ml
K 6511TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	1 x 15 ml
K 6511AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled or deionized water
- Precision pipettors calibrated to deliver 50-100 µl
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Microplate reader 450 nm

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** 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.
- The **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (500 ml WASHBUF + 450 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for one month.**
- The **STD** (Calibrators) and the **CTRL** (control) are ready to use and can be stored at **2-8°C** until the expiry date given on the label. Repeated thawing and freezing should be avoided.
- The **CONJ** (conjugate) must be diluted **1: 100** in ELISA wash buffer (100 µl CONJ + 10 ml ELISA wash buffer). The **undiluted CONJ** (conjugate) is stable at **2-8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted conjugate is not stable and can not be stored.**
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the expiry date (see label of test package) when stored at 2-8°C.

7. 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.
- Stop solution is composed of sulphuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spills should be wiped out immediately with copious quantities of water.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum

Serum must be diluted **1:50** with sample dilution buffer:

20 µl Serum /Plasma + 980 µl SAMPLEBUF (sample dilution buffer).

Faeces

Transfer about **100 mg** of the sample, accurately weighed (note the exact weight for calculation), into a flask with **5 ml** of **ELISA wash buffer** and mix. Centrifuge the diluted sample for 10 min at 3000 rpm. The resulting supernatant can be stored at -20°C for about 1 month. **100 µl** of the supernatant is used for the assay.

Immundiagnostik recommends the use of the sample tubes from Roche Diagnostics (Cat.-No. 745804) for sample preparation.

9. ASSAY PROCEDURE

Procedural notes

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Quality control guidelines should be observed.

- 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 wrong use.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

Test procedure

Wash the precoated microtiter plate **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**.
Carry out the tests in duplicate.

1. Add **100 µl** of **STD** (standard), **CTRL** (control) and **patient samples** (faeces and serum diluted, see above).
2. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
3. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**.
4. Add **100 µl** of diluted **CONJ** (conjugate).
5. Incubate for **1 hour** shaking on a horizontal mixer at room temperature.
6. Decant the content of the plate and wash the wells **5 x with 250 µl ELISA wash buffer**.
7. Add **100 µl** of **SUB** (TMB substrate solution).
8. Incubate for **5-10 minutes** at room temperature.
9. Add **50 µl** of **STOP** (stop solution) and mix shortly.
10. Determine absorption with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm as reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the measurement range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as reference.

10. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

We recommend a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum

For the calculation of the serum values the results must be multiplied by **50**.

Faeces

For the IgE concentration of faeces samples, calculate as described in the following example:

weight: 80 mg (1ml stool = 1g) = 0.08 ml

dilution step 1: 5ml / 0,08ml = 62.5

Multiply the result by **62.5** to get the real concentration. The dilution factor depends on the weight of the faeces.

11. LIMITATIONS

Samples with IgE levels greater than the highest calibrator should be further diluted and re-assayed.

12. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends commercial control samples for internal quality control.

Control samples should be analyzed 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.

Expected values

IgE (serum): 40-120 kU/l

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and put on the market according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Guidelines for medical laboratories should be observed.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

- 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 wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number

1/28/2008 04042002_IgE.DOC