

1. Cel badania

Zestaw do ilościowych oznaczeń swoistych alergenowo IgE w surowicy lub osoczu metodą immunoenzymatyczną. Zestaw do oznaczeń swoistych IgE został zweryfikowany z systemem Omega Diagnostics i oznaczone dane dotyczące wydajności zostały ustalone w oparciu o system Omega Diagnostics. W przypadku użycia z innymi systemami walidacja musi być wykonana przez użytkownika. Badania powinien wykonywać fachowy personel medyczny, przeszkolony w zakresie diagnostyki in vitro.

2. Wstęp

Immunoglobulina E jest białkiem surowiczym i nośnikiem aktywności reaginowej reakcji alergicznej typu I (natychmiastowej).

IgE krąży w krwiobiegu. Za objawy alergiczne reakcji typu I jest odpowiedzialna IgE związana na powierzchni mastocytów i granulocytów zasadochłonnych. Wiązanie następuje poprzez fragment Fc cząsteczki IgE. Jeżeli dojdzie do kontaktu alergenu ze swoistą, związaną IgE, następuje uwolnienie mediatorów prozapalnych i enzymów (np. histaminy). Nie da się ocenić IgE związanej stosując metodę do oznaczenia krążącej immunoglobuliny E. Dlatego wyniki oznaczeń swoistej IgE w surowicy powinny być tylko częścią postępowania diagnostycznego obejmującego staranny wywiad, testy skórne i prowokacyjne.

3. Zasada metody

Podstawą ilościowego oznaczania krążących swoistych IgE w surowicy/osoczu jest niekompetycyjna metoda immunoenzymatyczna. Faza stała składa się ze zaktwowanego chemicznie krążka papieru, z którym związane są kowalencyjnie odpowiednie alergeny. W pierwszej kolejności nanosi się surowicę lub osocze pacjenta na krążki alergenowe. Następuje wiązanie swoistych alergenowo IgE ze związanym z fazą stałą alergenem. Nadmiar surowicy zostaje usunięty w czasie płukania. W drugiej kolejności znakowane enzymatycznie przeciwciała przeciw ludzkim IgE tworzą kompleksy z alergenem i IgE na krążku alergenowym. Następuje przy tym łączenie znakowanych przeciwciał przeciw ludzkim IgE ze związanymi z fazą stałą swoistymi IgE. Nadmiar przeciwciał przeciw ludzkim IgE jest usuwany w czasie płukania. Ilość związanych znakowanych przeciwciał przeciw ludzkim IgE jest proporcjonalna do ilości obecnych w surowicy swoistych IgE. W następnym etapie dodawany jest roztwór substratu (p-nitrofenylofosforan). Dzięki obecności fosfatazy alkalicznej roztwór uzyskuje zabarwienie. Reakcję enzymatyczną zatrzymuje roztwór hamujący. Gęstość optyczną roztworu mierzy się za pomocą fotometru. Wyniki uzyskuje się na podstawie krzywej referencyjnej powstałej dzięki pomiarowi gęstości optycznej zagłębień z surowicami referencyjnymi.

4. Skład zestawu Allergozyme[®] Spec. IgE 96 test

- CONJ** Koniugat (Conjugate): 1 butelka (5ml) zawierająca mysie przeciwciała monoklonalne przeciw ludzkiej

IgE, znakowane fosfatazą alkaliczną, w zbuforowanym roztworze białkowym. Środek konserwujący : 0,02% azydek sodowy.

- WASH** **20x** **Roztwór płuczacy (koncentrat)** **[Washing solution (concentrate)]**: 1 butelka (25 ml) zawierająca zagęszczony roztwór NaCl z Tween 20. Środek konserwujący: 0,05% azydek sodowy. Przygotowanie roztworu płuczającego patrz p. 10.2.
- SUBS** **Substrat (Substrate)**: 1butelka z 10 ml p-nitrofenylofosforanu (pNPP).
- STOP** **Roztwór hamujący (Stop solution)**: 1 butelka z 10 ml 1 M wodorotlenku sodowego.
- MTP** **Mikroplątka (Micro-titration plate)**: 1 mikroplątka z płaskim dnem (96 dołków, łamana)

5. Inne niezbędne materiały i urządzenia

- Moduł referencyjny:**

<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> DISC	Krażki kalibracyjne (<i>Calibration discs</i>): 2 pudełka – 40 krążków referencyjnych (opłaszczonych przeciwciałami dla ludzkiej IgE), środek konserwujący: 0.02 % azydek sodowy
<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	Surowice kalibracyjne (<i>Calibration serums</i>) 1, 2, 3, 4, 5: Pięć fiolek, każda zawierająca po 0,5 ml ludzkiej surowicy o stężeniu całkowitej IgE kalibrowanej według WHO IRP 11/234. Środek konserwujący: 0,02% azydek sodowy. Zawierają albuminę surowicy bydłowej (BSA). Surowice referencyjne zawierają rosnące stężenie przeciwciał:

<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	1	Calibrator 1 = 0.35 IU/ml;
<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	2	Calibrator 2 = 1.0 IU/ml;
<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	3	Calibrator 3 = 3.5 IU/ml;
<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	4	Calibrator 4 = 10 IU/ml;
<input type="checkbox"/> CAL	<input type="checkbox"/> SERUM	5	Calibrator 5 = 50 IU/ml.
- Krażki alergenowe:**
Krażki alergenowe pakowane są po 10 lub 25 sztuk. Środek konserwujący: 0.02 % azydek sodowy
- Materiały i urządzenia:**
 - Mikropipeta z jednorazowymi końcówkami po 50 µl
 - Pipeta wielokanałowa np. Eppendorf-Multipete z Combitip 2,5 i 5.0 ml
 - Cylindry miarowe o pojemności 100 i 2000 ml
 - Folia samoprzylepna lub przykrycie mikroplątki
 - Jednorazowe rękawiczki, woda destylowana
 - Pinceta, stoper, drukarka
 - Czytnikiem do mikroplątek z filtrami 405/450/620 nm (np. TECAN Spectra lub TECAN Sunrise)
 - Inkubator dla mikroplątek Omega Diagnostics (37 °C)
 - Płuczka dla mikroplątek (np. Płuczka TECAN-Columbus lub ręczne urządzenie płuczające Omega Diagnostics)
 - Pipeta 8-kanałowa z jednorazowymi końcówkami po 250 µl (tylko dla Mini-Systemu)

6. Ograniczenia metody

- Warunkiem uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników jest wykonanie badania zgodnie z instrukcją (patrz punkt 10).
- Jeżeli oznaczenie wykonuje się na kilku mikroplątkach, należy przestrzegać czasu inkubacji poszczególnych płytek.
- Należy używać tylko ludzkiej surowicy i osocza
- Brak protokołu ponownego użycia produktu
- Rozpoznanie nie powinno się opierać na wyniku jednego oznaczenia swoistych alergenowo IgE, ale na innych badaniach laboratoryjnych i danych klinicznych. Oznaczenie in vitro swoistych IgE nie powinno być nigdy jedyną metodą diagnostyczną przed podjęciem immunoterapii swoistej. Dodatkowo należy wykonać testy skórne oraz – w miarę możliwości – testy prowokacyjne celem wykazania istotności klinicznej alergenu (patrz literatura p. 1).
- W przypadku alergenów pokarmowych szczególnie często zdarza się ujemny wynik badania in vitro, pomimo wyraźnych objawów klinicznych. Wyjaśnia się to procesami dojrzewania, obróbki przemysłowej, gotowania, smażenia, itd. Trawienie w przewodzie pokarmowym również może prowadzić do różnic pomiędzy białkiem in vivo a związanym w fazie stałej zestawu testowego. Ponadto niektóre pokarmy są bardzo wrażliwe na obróbkę, toteż nie wszystkie alergeny obecne w postaci natywnej udaje się związać w fazie stałej.
- Do oznaczeń haptenu wykorzystuje się ludzką albuminę. W ten sposób uzyskuje się pełny antygen do badań in vitro. Nie zawsze odzwierciedla to całkowity potencjał haptenu w organizmie człowieka. Nie zawsze więc wyniki badań in vitro zgadzają się z danymi klinicznymi.
- Ujemny wynik badania z jadami owadów świadczy jedynie o braku krążących swoistych IgE w czasie pobierania próbki surowicy/osocza. Nie można na tej podstawie wnioskować, że u pacjenta nie rozwinię się obecnie lub w przyszłości reakcja na użądlenie. Bezpośrednio po ekspozycji na skutek zużycia przeciwciał dochodzi do czasowego braku wykrywalnych swoistych IgE w surowicy.
- Ujemne wyniki badań in vitro mogą wystąpić, gdy:
 - objawy nie są IgE-zależne
 - próbki do badania pobrano zanim organizm był zdolny wyprodukować przeciwciała dla antygeny
 - poziom IgE spadł do minimum po upływie długiego czasu od uczulenia
- Identyczne wyniki u różnych pacjentów nie oznaczają identycznych reakcji.
- Dodatnie wyniki oznaczeń swoistych IgE nie muszą korelować z manifestacją kliniczną.
- Wiele przeciwciał klasy IgE wykazuje pomiędzy sobą reaktywność krzyżową, np. pyłek brzozy/jabłko, pyłek bylicy/seler, lateks/banan. Należy uwzględnić ten fakt w postępowaniu diagnostycznym.

7. Charakterystyka testu

- Swoistość analityczna
Nie jest spodziewane oddziaływanie i/lub reaktywność krzyżowa z innymi substancjami.
- Czułość analityczna
w dolnym zakresie pomiaru / między Standard 1 i 2:
> 0.060^{OD}/U_{ml}
w górnym zakresie pomiaru / między Standard 4 i 5:
> 0.009^{OD}/U_{ml}
- Swoistość diagnostyczna 100 %
- Czułość diagnostyczna > 90 %
- Dokładność 72 – 116 %
- Odtwarzalność
(Inter-Assay [basic classes]) CV < 8 %
- Powtarzalność
(Intra-assay [basic classes]) CV < 5 %
- Najniższy poziom oznaczania < 0.35 U/ml
- Zakres pomiaru 0,35 – 50 U/ml
- Kalibracja modułu referencyjnego dla sIgE:
WHO IRP 11/234

8. Ograniczenia i interferencje

Żółtaczka	< 0.1 mg/ml bilirubiny - bez znaczenia
Hemoliza	< 8 mg/ml hemoglobiny - bez znaczenia
Lipemia	< 5 mg/ml trójglicerydów
Nieswoiste IgE	< 1000 U/ml

9. Pobieranie i przechowywanie próbek krwi

Próbki surowicy lub osocza do badania można przechowywać do 5 dni w temperaturze 2 – 8°C. Jeżeli badanie nie może być wykonane w tym czasie, zaleca się zamrożenie w temperaturze -20°C (możliwe przechowywanie w -20°C min. 6 miesięcy). Unikać rozmrażania i zamrażania próbek!

10. Wykonanie badania

Uwaga, jednorazowo można wykonać badanie najwyżej 4 mikroplątki!

Test można przeprowadzić stosując krótki [wariant A] lub długi [wariant B] czas inkubacji.

Należy wybrać jeden z wariantów. Nie wolno łączyć czasów inkubacji z różnych wariantów, ponieważ może to prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników!

- Przed użyciem wszystkie reagenty należy doprowadzić do temperatury pokojowej (TP 20 – 25 °C).
- Przygotowanie płynu płuczającego: pobrać 25 ml koncentratu płynu płuczającego, dopełnić do 500 ml wodą destylowaną i starannie wymieszać. Rozcieńczony płyn płuczający może być przechowywany przez 24 godziny w temperaturze pokojowej w starannie oczyszczonych pojemnikach.
- Odczynniki i próbki dokładnie wymieszać.
- Opracować schemat rozmieszczenia surowic i standardów w zagłębieniach mikroplątki.

Uwaga: Zaleca się podwójne oznaczenie dla surowic referencyjnych.

- Używając pincety do każdego wgłębienia mikroplastyki włożyć krążek alergenowy lub referencyjny. Zwrócić uwagę na pozostawienie pustego miejsca w pozycji A1 (ślepa próba).
- Do wgłębień z krążkami referencyjnymi nałożyć pipetą po 50 µl surowic referencyjnych 1 - 5. Pipetować po 50 µl surowicy/osocza do wgłębień z krążkami alergenowymi. Wgłębienie A1 (próba ślepa) zostawić pustym.
- Płytkę przykryć lub zakleić i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C [wariant A] lub przez 3 godziny w temperaturze pokojowej [wariant B].
- Plukać zagłębienia mikroplastyki automatyczną lub ręczną płuczką 5x (objętość płynu płuczącego na jedno wgłębienie: 300 µl, czas namoczenia: 80 sekund, ilość cykli: 5). Tylko procedury płukania zaaprobowane przez Omega Diagnostics mogą być stosowane.
- Do każdego wgłębienia (oprócz ślepej próby) nałożyć pipetą 50 µl koniugatu. Płytkę przykryć lub zakleić i inkubować przez 1,5 godziny w temperaturze 37°C [wariant A] lub przez 16-24 godzin w temperaturze pokojowej [wariant B].
- Plukać jak w p. 10.8.
- Do wszystkich wgłębień (także do ślepej próby!) nałożyć po 100 µl roztworu substratu. Płytkę przykryć lub zakleić i inkubować bez dostępu światła przez 1 godzinę w temperaturze 37°C [wariant A] lub przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej [wariant B].
- W tej samej kolejności jak przy pipetowaniu roztworu substratu dodać 100 µl roztworu hamującego do każdego wgłębienia (w tym do ślepej próby).
- Po zatrzymaniu reakcji roztworem hamującym należy ocenić powstały kompleks barwny w ciągu 30 minut. Mikroplastykę należy włożyć do fotometru. Pomiar następuje poprzez krążek, który znajduje się na dnie zagłębienia.

A. Pomiar systemem firmy Omega Diagnostics z programem Allervance:
Pomiar odbywa się przy 3 długościach fal (405 i 450 nm jako długości pomiarowe oraz 620 nm jako długość fali referencyjnej). Umożliwia to ocenę wyników w większym zakresie pomiarowym.

B. Pomiar systemem firmy Omega Diagnostics bez programu Allervance:
Należy odczytać ekstynkcję przy długości fali 405 nm oraz przy długości referencyjnej 620 nm. W każdym wypadku należy wykonać kombinowany pomiar 405/620 nm. Jeżeli nie uzyskano wyniku dla surowicy referencyjnej nr 5, to został przekroczony zakres pomiarowy fotometru. W tym rzadkim przypadku należy odpipetować po 250 µl roztworu z każdego dołka do pustej mikroplastyki i jeszcze raz wykonać pomiar przy długości 405 nm.

Po rozpoczęciu oznaczeń wszystkie etapy reakcji muszą przebiegać według instrukcji, bez żadnych przerw i przy zachowaniu tych samych temperatur i czasów reakcji.

Uwaga! W przypadku istotnych zmian w sposobie wykonania badania (np. czas, kolejność, temperatura, itd.) lub jeśli przy właściwym wykonaniu widoczne są nieprawidłowości analityczne (np. wartości dla surowic kontrolnych poza dopuszczalnym zakresem, duże różnice w oznaczeniach podwójnych), nie należy wykorzystywać uzyskanych wyników. Przed kontynuowaniem oznaczeń konieczne jest sprawdzenie testów. W wątpliwych przypadkach należy zwrócić się do dystrybutora testów.

11. Obliczanie wyników

Urządzenia Omega Diagnostics automatycznie przygotowują krzywą kalibracyjną i obliczają wyniki próbek pacjentów.

Surowice referencyjne	Miano przeciwciał
1	0,35 IU/ml
2	1,0 IU/ml
3	3,5 IU/ml
4	10,0 IU/ml
5	50,0 IU/ml

Relacja pomiędzy stężeniem IgE w U/ml a klasami EAST jest następująca:

< 0.35 U/ml	= EAST class 0
≥ 0.35 < 0.7 U/ml	= EAST class 1
≥ 0.7 < 3.5 U/ml	= EAST class 2
≥ 3.5 < 17.5 U/ml	= EAST class 3
≥ 17.5 < 50 U/ml	= EAST class 4
≥ 50 U/ml	= EAST class 5

12. Prawidłowe wartości stężenia sIgE

- wartości < 0,35 U/ml = EAST klasa 0 - wynik negatywny
- wartości ≥ 0,35 U/ml = EAST klasa ≥ 1 - wynik pozytywny

Patrz również p. 6 „Ograniczenia metody” oraz pozycje literatury nr 1 i 2.

13. Ostrzeżenia i specjalne środki ostrożności

Należy przestrzegać następujących zasad:

- Posługując się elementami zestawu należy przestrzegać zasad bezpieczeństwa.
- Surowice referencyjne i próbki pacjentów stanowią materiał potencjalnie zakaźny. W razie skażenia nim należy użyć właściwych środków dezynfekcyjnych. Surowice referencyjne nie wykazują obecności HB_sAg, HCV and HIV- 1/2.
- Roztwór hamujący zawiera wodorotlenek sodu, który ma właściwości żrące! Ubiierz rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / twarzy. W przypadku kontaktu ze skórą (lub na włosy): zdjąć zanieczyszczoną odzież natychmiast. Spłukać i przemyć skórę wodą. W przypadku kontaktu z oczami: dokładnie przemyć wodą przez kilka minut. Jeśli to możliwe, usunąć szkła kontaktowe. Nadal płukać. Należy skonsultować się natychmiast z lekarzem. Wyprać Zanieczyszczoną odzież należy wyprać przed ponownym założeniem.
- Nie palić papierosów, nie jeść i nie pić w laboratorium.
- Nie pipetować ustami!
- Wszystkie odczynniki zamknąć po użyciu. Nie zamieniać zakrętek pomiędzy odczynnikami.
- Unikać krzyżowej kontaminacji w czasie pipetowania!
- Nie należy łączyć ze sobą odczynników pochodzących z różnych serii
- Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności.
- W celu zapewnienia prawidłowych wyników należy zawsze nastawiać próbki referencyjne i kontrole.

- Należy regularnie kontrolować sprawność i dokładność stosowanego sprzętu (pipety, fotometr, itd.). Należy przestrzegać zaleceń producenta!
- Postępowanie i usuwanie odczynników i innych chemikaliów powinno być zgodne z obowiązującymi przepisami.

Lista materiałów, które należy traktować szczególnie ostrożnie:

- Koniugat** (azydek sodu < 0,1% w/w
CAS 26628-22-8;
albumina surowicy bydłowej CAS 90604-29-8)
- Roztwór płuczący** (azydek sodu < 0,1% w/w
CAS 26628-22-8)
- Substrat** (p-nitrofenylofosforan CAS 4264-83-9)
- Roztwór hamujący** (wodorotlenek sodu 1M
CAS 1310-73-2)
- Surowice referencyjne** (azydek sodu < 0,1% w/w
CAS 26628-22-8;
albumina surowicy bydłowej CAS 90604-29-8)

14. Kontrola jakości

- Wewnętrzna kontrola jakości**
W każdym teście zaleca się oznaczenie co najmniej jednej próbki surowicy kontrolnej pozytywnej i surowicy pacjenta. W ofercie Omega Diagnostics znajdują się surowice kontrolne. Dla surowic dodatnich Omega Diagnostics podaje zakres prawidłowych stężeń. Jeżeli wynik surowicy dodatniej się w podanym zakresie można założyć, że badanie zostało przeprowadzone prawidłowo.
Zaleca się prowadzenie karty kontroli jakości.
- Zewnętrzna kontrola jakości**
Zaleca się udział w zewnętrznym systemie kontroli jakości. Probki o nieznanym stężeniu są wysyłane do laboratoriów. Po zebraniu wszystkich wyników instytucja prowadząca kontrolę ocenia wszystkie przesłane wyniki. Szczegóły można uzyskać w instytucji prowadzącej kontrolę zewnętrzną lub prosząc o kontakt z Omega Diagnostics.

15. Warunki przechowywania testu

2 to 8 °C

16. Termin ważności

Zestaw można używać do daty ważności określonej od daty produkcji wyrobu i podanej na zestawie oraz elementach składających. Datą ważności jest ostatni dzień miesiąca podany na butelce i etykietce zestawu. Nie używać odczynników po dacie ważności.

17. Literatura

- Ring J., 1992, Angewandte Allergologie [Applied Allergology]. MMW Verlag, München
- R. Wahl, R. Krause: Methoden der In-vitro-Allergiediagnostik und deren Stellenwert unter Berücksichtigung ihrer technischen Aspekte. [Methods of in-vitro allergy diagnostics and their importance, in consideration of their technical aspects] Allergologie 33/3, 2010, 121-133.

18. Obowiązki instrukcji

Instrukcja wykonania oznaczenia obowiązuje od 07.12.2015.

19. Informacje o zamawianiu

Allergozyme® Spec. IgE 96 test
Moduł referencyjny dla swoistej IgE 96 ozn.
Mikroplastyki Greiner
Krążki alergenowe

Nr katalogowy
REF 36021000
REF 6120000
REF 36921000

patrz katalog
krążków alergenowych
Omega Diagnostics
patrz katalog
Omega Diagnostics

Kontrola pozytywna i negatywna

20. Wytwórca

Omega Diagnostics GmbH

Herrengraben 1
D-21465 Reinbek – Germany
☎ ++49-40-636654-100
Fax ++49-40-636654-111

Dystrybucja w Polsce:

NEXTER Sp. z o.o.
ul. Graniczna 66
44-178 Przyszowice
Tel (32) 2571 301
Fax (32) 2514 113
www.nexter.pl
e-mail: nexter@nexter.pl