

1. Cel badania

Zestaw do ilościowych oznaczeń całkowitej 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 reakcji alergicznej typu I (natchmiastowej). 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). W teście Total IgE pomiar obejmuje wszystkie swoiste przeciwciała klasy IgE w surowicy, jest więc testem zbiorczym pomocnym w interpretacji innych wyników diagnostycznych, nie pozwala natomiast potwierdzić uczulenia na określony alergen. Dlatego wyniki oznaczeń całkowitej IgE w surowicy powinny być tylko częścią postępowania diagnostycznego obejmującego staranny wywiad, testy skórne, prowokacyjne oraz inne badania in vitro.

3. Zasada metody

Podstawą ilościowego oznaczania krążącej całkowitej IgE w surowicy/osoczu jest niekompetycyjna metoda immunoenzymatyczna. Faza stała obejmuje zagłębienie mikroplótki, na którego wewnętrznej powierzchni są związane adsorpcyjnie przeciwciała anti-IgE.

W pierwszej kolejności pipetuje się do zagłębienia surowicę lub osocze pacjenta oraz roztwór rozcieńczalnika. Następuje łączenie całkowitej IgE ze związanymi z fazą stałą przeciwciałami anti-IgE. Niezwiązana surowica jest usuwana w czasie płukania. W drugiej kolejności dodaje się znakowane enzymatycznie przeciwciała przeciw ludzkim IgE. Następuje wiązanie znakowanych przeciwciał anti-IgE z całkowitą IgE. Niezwiązane znakowane przeciwciała przeciw ludzkiej IgE są usuwane w czasie płukania.

Ilość związanych znakowanych przeciwciał przeciw ludzkiej IgE jest proporcjonalna do ilości obecnej w surowicy/osoczu całkowitej IgE. W następnym etapie dodawany jest roztwór substratu (p-nitrofenylofosforan). Dzięki obecności fosfatazy alkalicznej roztwór uzyskuje zabarwienie. Reakcję enzymatyczną zatrzymuje roztwór hamujący. Ekstynkcję roztworu mierzy się za pomocą fotometru. Wyniki uzyskuje się na podstawie krzywej referencyjnej powstałej dzięki pomiarowi ekstynkcji standardów.

4. Skład zestawu cIgE ELISA RV

- [CONJ]** Koniugat (Conjugate): 1 butelka (12ml) zawierająca mysie przeciwciała monoklonalne przeciw ludzkiej IgE, znakowane fosfatązą alkaliczną, w zbuforowanym roztworze białkowym. Środek konserwujący : 0,02% azydek sodowy. Różnice w kolorze nie mają wpływu na skuteczność koniugatu.

- [WASH 20x]** Roztwór płuczający (koncentrat) [Washing solution (concentrate)]: 1 butelka (50 ml) zawierająca zagęszczony roztwór NaCl z Tween 20. Środek konserwujący: 0,05% azydek sodowy. Przygotowanie roztworu płuczającego patrz p. 10.2.

- [SUBS]** Substrat (Substrate): 1 butelka (12 ml) p-nitrofenylofosforanu (pNPP).

- [STOP]** Roztwór hamujący (Stop solution): 1 butelka (6 ml) 1 M wodorotlenku sodowego.

- [DIL AS]** Roztwór rozcieńczalnika (Diluent solution) : 1 butelka (12 ml) roztworu rozcieńczalnika. Środek konserwujący: 0,05% azydek sodowy.

- [MTP]** Mikroplótkka łamana (Micro-titration plate [snap-off]): 1 mikroplótkka - 12 pasków z 8 dołkami każdy, opłaszczony przeciwciałami mysiej i przeciw ludzkiej IgE.

- [CAL SERUM]** Surowice kalibracyjne (Calibration system). Pięć fiolek, każda zawierająca po 0,3 ml ludzkiej IgE, kalibrowanych według WHO IRP 11/234. Środek konserwujący: 0,02% azydek sodowy.

Surowice referencyjne zawierają rosnące stężenie przeciwciał:

[CAL SERUM 1]	Calibrator 1 = 5 IU/ml;
[CAL SERUM 2]	Calibrator 2 = 50 IU/ml;
[CAL SERUM 3]	Calibrator 3 = 100 IU/ml;
[CAL SERUM 4]	Calibrator 4 = 200 IU/ml;
[CAL SERUM 5]	Calibrator 5 = 1000 IU/ml.

5. Inne niezbędne odczynniki, materiały i urządzeniaMateriały i urządzenia:

- Mikropipeta z jednorazowymi końcówkami po 10 µl
- Pipeta wielokanałowa np. Eppendorf-Multipette z Combitip 2,5 oraz 5,0 ml
- Skalowane cylinder o pojemności 2000 ml
- Folia samoprzylepna lub przykrycie mikroplótki
- Jednorazowe rękawiczki
- Woda destylowana
- Stoper
- Drukarka
- Fotometr z czytnikiem do mikroplótek dla długości fali 405 nm (TECAN Spectra lub TECAN Sunrise)
- Inkubator do mikroplótek Omega Diagnostics (37 °C)
- Płuczka do mikroplótek (Płuczka TECAN-Columbus, TECAN-Hyoflex lub ręczne urządzenie płuczające Omega Diagnostics)

6. Ograniczenia metody

- Warunkiem uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników jest wykonanie badania zgodnie z instrukcją (patrz punkt 10).
- Jeżeli oznaczenie wykonuje się na kilku mikroplótkach, należy przestrzegać czasu inkubacji poszczególnych plótek.

- Rozpoznanie nie powinno opierać się wyłącznie na wyniku oznaczenia całkowitej IgE, ale na innych badaniach laboratoryjnych i danych klinicznych. Oznaczenie in vitro całkowitej IgE nie powinno być nigdy jedyną metodą diagnostyczną przed podjęciem immunoterapii swoistej lub włączeniem innego leczenia. Dodatkowo należy wykonać testy skórne, inne testy in vitro (np. swoiste IgE) oraz – w miarę możliwości – testy prowokacyjne celem wykazania istotności klinicznej alergenu (patrz literatura p. 1).

- Ujemne wyniki lub niskie stężenia całkowitej IgE mogą wystąpić, gdy:

- objawy nie są IgE-zależne
- próbki do badania pobrano zanim organizm był zdolny wyprodukować przeciwciała dla antygenów
- poziom IgE spadł do minimum po upływie długiego czasu od uczulenia

- Identyczne wyniki u różnych pacjentów nie oznaczają identycznych reakcji.

- Dodatnie wyniki oznaczeń całkowitej IgE nie muszą korelować z manifestacją kliniczną.

Podwyższone stężenie całkowitej IgE może wskazywać na predyspozycję atopową. W szczególnych przypadkach oznaczenie całkowitej IgE może uzupełniać diagnostykę schorzeń skojarzonych z atopią (np. płuco farmera, zapalenie naczyń) oraz wrodzonych i nabytych niedoborów immunologicznych (zespół hyper-IgE lub defekty limfocytów T) (patrz literatura p. 1).

Całkowita IgE w połączeniu z oznaczeniem swoistych IgE stanowi dodatkowy parametr oceny miana swoistych IgE, ale nie może potwierdzić ani wykluczyć swoistego uczulenia. Przydatność do skriningu w kierunku atopii jest ograniczona.

7. Charakterystyka testu

-Swoistość analityczna nie jest spodziewana reaktywność krzyżowa z IgG do 25 mg IgG/ml

- Odtwarzalność (Inter-Assay [basic IU/ml]) CV < 12 %
 - Powtarzalność (Intra-assay [basic IU/ml]) CV < 7 %
 - Dokładność (odzysk) 109,4%
 (3 surowice, każda z 3 pomiarami w zakresie 55-440 IU/ml; CV < 20%)
 - dolna granica zdolności pomiaru < 5 IU/ml
 - zakres pomiaru 5 – 1000 IU/ml
 Kalibracja standardów dla cIgE: WHO IRP 11/234
 Dodatkowe informacje mogą być dostarczone na życzenie. Prosimy o kontakt z dystrybutorem testu.

8. Ograniczenia i interferencje

Żółtaczka	0 - 0,1 mg/ml bilirubiny - bez znaczenia
Hemoliza	0 - 8 mg/ml hemoglobiny - bez znaczenia
Lipemia	0 - 5 mg/ml trójglicerydów - bez znaczenia

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

- Przed użyciem wszystkie reagenty należy doprowadzić do temperatury pokojowej (TP 20 – 25°C).
 - Przygotowanie płynu płuczającego: pobrać 50 ml koncentratu płynu płuczającego, dopełnić do 1000 ml wodą destylowaną i starannie wymieszać. Rozcieńczony płyn płuczający może być przechowywany przez 24 godziny w temperaturze pokojowej w starannie oczyszczonych pojemnikach.
 - Opracować schemat rozmieszczenia surowic i standardów w zagłębieniach mikroplótki.
Uwaga: Zalecane jest podwójne oznaczenie dla surowic referencyjnych.
 - Do odpowiednich wgłębień nałożyć pipetą po 10 µl surowic referencyjnych 1 - 5. Następnie pipetować po 10 µl surowicy/osocza pacjentów do pozostałych wgłębień. Wgłębienie A1 (próbka ślepa) zostawić puste.
 - Do każdego wgłębienia (do ślepej próby również) nałożyć pipetą po 100 µl roztworu rozcieńczalnika.
 - Płótkę przykryć i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C.
 - Płukać zagłębienia mikroplótki 4x automatyczną płuczka lub 5x ręczną płuczka Omega Diagnostics (należy przestrzegać instrukcji obsługi!). Stosować procedury płukania zaaprobowane przez Omega Diagnostics.
 - Do każdego wgłębienia (do ślepej próby również) nałożyć pipetą po 100 µl koniugatu.
 - Płótkę przykryć lub zakleić i inkubować przez 1 godzinę w temperaturze 37°C.
 - Płukać zagłębienia mikroplótki 4x automatyczną płuczka lub 5x ręczną płuczka Omega Diagnostics (należy przestrzegać instrukcji obsługi!). Stosować procedury płukania zaaprobowane przez Omega Diagnostics.
 - Do wszystkich wgłębień (także do ślepej próby!) nałożyć po 100 µl roztworu substratu.
 - Płótkę przykryć lub zakleić i inkubować bez dostępu światła przez 1 godzinę w temperaturze 37°C.
 - Dozować roztwór hamujący w tej samej kolejności jak roztwór substratu. Nałożyć pipetą po 50 µl roztworu hamującego do każdego wgłębienia (do ślepej próby również).
 - Po zatrzymaniu reakcji roztworem hamującym należy ocenić powstały kompleks barwny w ciągu 30 minut. Mikroplótkę należy włożyć do fotometru. Pomiar prowadzi się przy długości fali 405 nm.
 - Przy każdym badaniu należy oznaczyć stężenia kontroli dodatniej.
- 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 oznacze-

niach podwójnych), nie należy wykorzystywać uzyskanych wyników. Przed kontynuowaniem oznaczeń konieczne jest sprawdzenie urządzeń, testów i procedur. W wątpliwych przypadkach należy zwrócić się do dystrybutora testów.

11. Odczyt wyników

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

Standard	Stężenie IgE
1	5 IU/ml
2	50 IU/ml
3	100 IU/ml
4	200 IU/ml
5	1000 IU/ml

Krzywa standardowa może być wykreślona manualnie. W tym celu zmierzoną ekstynkcję dla każdego kalibratora należy zaznaczyć na papierze milimetrym półlogarytmicznym. Następnie, za pomocą linijki, powstałe punkty należy połączyć. Tak uzyskana krzywa standardowa może być używana dla określenia wartości próbek.

12. Prawidłowe wartości stężenia cIgE

Wartości powyżej 100 IU/ml mogą wskazywać u dorosłych na możliwość atopii. Patrz również p. 6 „Ograniczenia metody” oraz pozycja literatury nr 1. Wartości prawidłowe dla dzieci patrz literatura nr 3.

13. Ostrzeżenia i specjalne środki ostrożności

Należy przestrzegać następujących zasad:

1. Posługując się elementami zestawu należy przestrzegać zasad bezpieczeństwa.
2. Surowice referencyjne i próbki pacjentów stanowią materiał potencjalnie zakaźny. W razie skażenia nimi należy użyć właściwych środków dezynfekcyjnych. Surowice referencyjne nie wykazują obecności HB_sAg, HCV and HIV- 1/2.
3. Roztwór hamujący zawiera wodorotlenek sodu, który ma właściwości żrące! Ubierz rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / ochronę twarzy. W przypadku kontaktu ze skórą (lub z włosami): 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. Zanieczyszczoną odzież należy wyprać przed ponownym założeniem.
4. Nie palić papierosów, nie jeść i nie pić w laboratorium.
5. Nie pipetować ustami!
6. Wszystkie odczynniki zamknąć po użyciu. Nie zamieniać zakrętek pomiędzy odczynnikami.
7. Nie należy używać uszkodzonych lub zanieczyszczonych elementów zestawu.
8. Unikać krzyżowej kontaminacji w czasie pipetowania!
9. Nie należy łączyć ze sobą odczynników pochodzących z różnych serii

10. Nie stosować odczynników po upływie terminu ważności.
11. W celu zapewnienia prawidłowych wyników należy zawsze nastawiać próbki referencyjne i kontrole.
12. Należy regularnie kontrolować sprawność i dokładność stosowanego sprzętu (pipety, fotometr, itd.). Należy przestrzegać zaleceń producenta!
13. 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 płuczający** (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;
surowica ludzka)

14. Kontrola jakości

• Wewnętrzna kontrola jakości

W każdym teście zaleca się oznaczenie dwóch kontroli pozytywnej (jeżeli jest dostępna) i surowicy pacjenta. W ofercie Omega Diagnostics znajdują się surowice kontrolne. Dla surowic dodatnich Omega Diagnostics podaje zakres prawidłowych stężeń. Jeżeli wynik surowicy dodatniej mieści 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 proszę o kontakt z Omega Diagnostics.

15. Warunki przechowywania

2 – 8 °C

16. Termin ważności

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

17. Literatura

1. Ring J., 1992, Angewandte Allergologie [Applied Allergology], MMW Verlag, München
2. 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 consid-

eration of their technical aspects] Allergologie 33/3, 2010, 121-133.

3. Renz H., et al.: In-vitro-Allergiediagnostik, Leitlinie der DGAKI, ÅDA, GPA und DGG [In-vitro allergy diagnosis, guideline of the DGAKI, ÅDA, GPA und DGG], Allergo Journal 2010; 19: 110 – 128.

18. Obowiązanie instrukcji

Instrukcja wykonania oznaczenia obowiązuje od 08.01.2015r.

19. Informacje o zamawianiu

Allergozyme® Total IgE Nr katalogowy REF 36040000

20. Wytwórca

Omega Diagnostics GmbH
Herrengraben 1
DE-21465 Reinbek – Germany
Tel. +49 40 636654-0
Fax +49 40 636654-333
URL www.omegadiagnostics.de
E-Mail info@omegadiagnostics.de

Dystrybucja w Polsce :

NEXTER Sp. z o.o.

ul. Graniczna 66
44-178 Przystowice
Tel. 32 2571 301
Fax 32 2514 113
URL www.nexter.pl
E-Mail nexter@nexter.pl