

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

---



## IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA



**DE40188**



**96**



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**INHALTSVERZEICHNIS / TABLE OF CONTENTS / ÍNDICE**

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION .....	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	3
5. REAGENTS PROVIDED .....	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED .....	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING .....	5
8. ASSAY PROCEDURE.....	5
9. EVALUATION.....	6
10. ASSAY CHARACTERISTICS .....	6
11. REFERENCES .....	7
1. VERWENDUNGSZWECK.....	8
2. KLINISCHE BEDEUTUNG .....	8
3. TESTPRINZIP .....	8
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	9
5. INHALT DES TESTBESTECKS .....	9
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	10
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	10
8. TESTDURCHFÜHRUNG .....	11
9. AUSWERTUNG.....	12
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	12
11. LITERATUR.....	13
12. KURZANLEITUNG .....	14
1. USO PREVISTO.....	15
2. INFORMACIÓN GENERAL.....	15
3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	15
4. LIMITACIONES, PRECAUCIONES Y COMENTARIOS GENERALES.....	16
5. REACTIVOS SUMINISTRADOS.....	16
6. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS.....	17
7. RECOLECCIÓN Y MANEJO DEL ESPECIMEN (MUESTRA) .....	17
8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO .....	18
9. EVALUACIÓN .....	18
10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	19
11. REFERENCIAS .....	19
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....	20

## 1. INTENDED USE

The Demeditec IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA Test Kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgG<sub>4</sub> antibodies against food antigens in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of Demeditec. Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

## 2. GENERAL INFORMATION

Incompatibility reactions against food may cause various symptoms in the human organism and this disturbance is manifested in the immune system by the formation of specific IgE, IgG or IgG<sub>4</sub> antibodies. Statistics show that 60% of the population suffer from intolerances against at least one foodstuff, which may cause clinical symptoms or enhance them. Hints may be various and reach from skin irritations over digestive disorders up to migraine. With the diagnostic findings of unspecific discomfort, allergies or intolerances against food should be clarified. The theoretical basis for the determination of specific IgG or IgG<sub>4</sub> for the diagnosis of food intolerances depends on the observation that some subclasses of IgG (mainly IgG<sub>4</sub>) are connected to the in vitro degranulation of basophilic cells and mastocytes and the activation of the complement cascade. It was also observed that high concentrations of circulating IgG were measured in atopic persons. Already early surveys showed that in persons with inflammatory reactions against food IgG but not IgE was detected. Significantly enhanced IgG and IgG<sub>4</sub> titers were also found in patients with food intolerances. Skin tests are relatively poorly correlated to food allergies and are only significant in the presence of IgE related reactions. As additional diagnostic tools provocation and elimination diets are applied. These methods depend strongly on the motivation and compliance of the patient. Due to these constraints nowadays serological determinations of antibodies against various food panels are applied increasingly. The two reactions related with the immune system differ insofar as the IgE associated food allergy occurs within the next hour following the food intake, while IgG/IgG<sub>4</sub> intolerances show a delayed reaction of 24 to 120 hours and persistent symptoms may arise.

## 3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Demeditec IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). 88 different food antigens and 8x reference antigens (egg white) for standards and controls are bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards and controls are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgG<sub>4</sub> antibodies of the serum and the immobilized antigens takes place. After a one hour incubation at 37°C, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgG<sub>4</sub>-AP conjugate is added and incubated for 30 minutes at 37°C. After a further washing step, the substrate (PNPP) solution is pipetted and incubated for 60 minutes at 37°C, inducing the development of a yellow dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 405 nm. The concentration of the IgG<sub>4</sub> antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

## 4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25°C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.

- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

## 5. REAGENTS PROVIDED

The IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA kit contains sufficient reagents for one patient (88 determinations). The first strip of the plate contains reference antigen (egg white, f01) for the generation of a calibration curve and the determination of controls.

Symbol	Components	Volume / Qty.
<b>SORB</b> <b>MT</b>	Food/Reference antigen coated microtiter plate	1
<b>CAL</b> <b>A – F</b>	Standards: 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50, 100 U/mL	0.5 mL each
<b>CONTROL</b> <b>low &amp; high</b>	Controls: weak positive, strong positive	0.5 mL each
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b>	Anti-human IgG <sub>4</sub> Enzyme Conjugate	15 mL
<b>SUB</b> <b>PNPP</b>	Substrate	15 mL
<b>STOP</b> <b>SOLN</b>	Stop Solution	15 mL
<b>SAM</b> <b>DIL</b>	Sample Diluent	40 mL
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>10x</b>	Washing Buffer (10x)	60 mL

### Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

#### 5.1. **SORB** **MT** Microtiter Plate

1 microtiter plate, coated with 88 food antigens (see distribution scheme) and 8x reference antigen (1. strip, color coded black). Ready-to-use.

#### 5.2. **CAL** **A – F** Standards A-F

6 x 0.5 mL, human plasma diluted with PBS/BSA, with 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50 and 100 U/mL of IgG<sub>4</sub> antibodies against egg white (f1). Addition of 0.05% sodium azide. Ready-to-use.

#### 5.3. **CONTROL** **low** Weak Positive Control

0.5 mL, human plasma diluted with PBS/BSA, including low concentrations of IgG<sub>4</sub> antibodies. Addition of 0.05% sodium azide. Ready-to-use.

#### 5.4. **CONTROL** **high** Strong positive Control

0.5 mL, human plasma diluted with PBS/BSA, including high concentrations of IgG<sub>4</sub> antibodies. Addition of 0.05% sodium azide. Ready-to-use.

#### 5.5. **ENZ** **CONJ** Anti-human-IgG<sub>4</sub> Enzyme Conjugate

15 mL, mouse-a-human-IgG<sub>4</sub>-AP, in proteinaceous buffer solution. Addition of 0.01% methylisothiazolone, 0.01% bromonitrodioxane and 5 mg/L Proclin™. Ready-to-use.

#### 5.6. **SUB** **PNPP** Substrate

15 mL, PNPP (Paranitrophenylphosphate). Ready-to-use.

#### 5.7. **STOP** **SOLN** Stop Solution

15 mL, 1 M sodium hydroxide. Ready-to-use.

**5.8. SAM DIL Sample Diluent**

40 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.05% sodium azide. Ready-to-use.

**5.9. WASH SOLN 10x Washing Buffer**

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

**6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- 100 µL and 1000 µL micro- and multichannel pipettes
- Microtiter Plate Reader (405 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

**7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8°C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20°C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 100 µL serum + 10 mL sample diluent).

**8. ASSAY PROCEDURE****8.1. Preparation of Reagents**

**Washing Solution:** dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37°C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8°C.

**8.2. Assay Steps**

1. For each patient sample prepare one microtiter plate.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells (see distribution scheme).
3. Cover plate and incubate for 60 minutes at 37°C.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells.
6. Cover plate and incubate for 30 minutes at 37°C.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells.
9. Cover plate and incubate for 60 minutes at 37°C.
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 405 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

## 9. EVALUATION

The evaluation can be performed either in units per mL (U/mL) or in classes.

### Example

Standard	Class	OD-Value
0.35 U/mL	1	0.156
0.7 U/mL	2	0.212
3.5 U/mL	3	0.445
17.5 U/mL	4	1.035
50 U/mL	5	1.660
100 U/mL	6	2.569

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

### Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA test kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. The values for controls and standards in units are printed on the labels of the vials. For a quantitative evaluation the absorptions of the standards are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values or the respective reaction class for controls and each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

## 10. ASSAY CHARACTERISTICS

Spez. IgG <sub>4</sub> ELISA	Egg White	Cow's Milk	Tomato
Intra-Assay-Precision	7.7 %	8.0 %	8.7 %
Inter-Assay-Precision	6.6 – 10.9 %	8.4 – 13.0 %	4.6 – 7.4 %
Inter-Lot-Precision	2.5 – 11.4 %	5.6 – 11.8 %	0.5 – 9.6 %
Analytical Sensitivity	0.22 U/mL	0.17 U/mL	0.16 U/mL
Recovery	90 – 107 %	89 – 103 %	87 – 97 %
Linearity	82 – 114 %	73 – 100 %	102 – 120 %
Cross-Reactivity	No cross reactivity towards IgE up to 100000 IU/mL.		
Interferences	No interferences with bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL.		
Clinical Specificity	88 %	86 %	90 %
Clinical Sensitivity	86 %	94 %	80 %

**11. REFERENCES**

1. Aas K: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. *Clinical Allergy* 1978; 8:39-50.
2. AMA Council on Scientific Affairs, In Vitro Testing for Allergy. Report II of the Allergy Panel Council on Scientific Affairs. *JAMA*, 1987, 258(12):1639-43.
3. AMA Council on Scientific Affairs, In Vivo Diagnostic Testing and Immunotherapy for Allergy. Part I, *JAMA*, 1987, 258:1363-7.
4. Bleumink E: Food Allergy; the chemical nature of the substance eliciting symptoms. *World Reviews in Nutrition and Diet* 1970; 12:505-570.
5. Bübl, R. Schön, B., Rakoski, J.: Allergenspezifische IgG-Antikörper bei Atopikern; *Allergologie* 16, 7, 299-304 (1993).
6. Canadian Paediatric Society, Allergy Section. Blood Tests for Allergy in Children. *Can Med Assoc J*, 1990, 142(11):1207-8.
7. Cohen, G.A., Hartmann, G., Hamburger, R.N., O'Connor, R.D.: Severe anemia and chronic bronchitis associated with a markedly elevated specific IgG to cow's milk protein; *Annals of Allergy* 55, 38-40 (1985).
8. Devey, M.E., Wilson, D.V., Wheeler, A.W.: The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay-fever patients during hyposensitization; *Clin. Allergy* 6, 227 (1976).
9. Durham, S.R., Lee, T.H., Cromwell, O., Shaw, R.J., Merret, T.G., Merret, J., Cooper, P, Kay, A.B.: Immunologie studies in allergen-induced late-phase asthmatic reactions; *J. Allergy Clin Immunol* 74, 49 (1984).
10. Djurup, R., Osterballe, O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapie; *Allergy* 39, 433-441(1984).
11. Rowntree, S., Platt-Mills, T.A.E, Cogswell, J.J, Mitchell E.B.: A subclass IgG<sub>4</sub>-specific antigen-binding Radioimmunoassay (RIA): Comparison between IgG and IgG<sub>4</sub> antibodies to food and inhaled antigens in adult atopic dermatitis after desensitization treatment and during development of antibody responses in children; *J. Allergy Clin. Immunol* 80, 622-630 (1987).
12. Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D.R., Smith, E., Fairburn, E.: Elevated serum IgG and IgG<sub>4</sub> in patients with atopic dermatitis; *Br. J. Derm*: 97, 59-63 (1977).
13. Wojdani, A., Etessami, S., Cheung, G.P.: IgG is not the only inhibitor of IgE in the RAST test; *Annals of Allergy* 55, 463-468 (1985).
14. Wüthrich, Brunello: Neurodermitis atopica (atopische Dermatitits) in Fuchs/Schulz, *Manuale Allergologicum* V, 14, 21-22.

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgG<sub>4</sub>-Antikörpern gegen Nahrungsmittelantigene im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von Demeditec erfragt werden. Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

## 2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Unverträglichkeitsreaktionen auf Nahrungsmittel können eine Reihe von Krankheitssymptomen im gesamten menschlichen Organismus erzeugen, wobei diese Störung im Immunsystem einerseits durch das Auftreten von spezifischem IgE, andererseits durch spezifisches IgG manifestiert wird. Statistiken zeigen, dass 60% der Bevölkerung unter Intoleranzen gegen zumindest ein Nahrungsmittel leiden, wodurch Krankheitssymptome erzeugt oder verschlechtert werden können. Die Hinweise können sehr unterschiedlich sein und reichen von Hautausschlägen über Verdauungsstörungen bis zur Migräne. Bei der Befundung unspezifischer Gesundheitsprobleme sollten heute Nahrungsmittelallergien oder Intoleranzen routinemäßig abgeklärt werden. Die theoretische Grundlage für die Bestimmung von spezifischem IgG und IgG<sub>4</sub> bei der Diagnose von Nahrungsmittel-Unverträglichkeiten beruht auf Erkenntnissen, dass bestimmte Subklassen von IgG (vor allem IgG<sub>4</sub>) mit der in-vitro Degranulation von basophilen und Mast-Zellen und der Aktivierung der Komplementkaskade in Verbindung stehen. Außerdem wurde beobachtet, dass hohe Konzentrationen von zirkulierendem IgG bei atopischen Personen gemessen wurden. Schon frühe Studien zeigten, dass bei Personen mit entzündlichen Reaktionen auf Nahrungsmittel kein IgE, wohl aber IgG nachgewiesen wurde. Deutlich erhöhte IgG und IgG<sub>4</sub> Spiegel wurden auch bei Patienten beobachtet, die Nahrungsmittelintoleranzen zeigten. Hauttestungen sind relativ schlecht mit Nahrungsmittelallergien korreliert und treten nur bei IgE-vermittelten Reaktionen auf. Als weitere Diagnostik werden Provokations- und Eliminations-Diäten eingesetzt, die aber zeitaufwendig sind und stark von der Motivation und der Compliance des Patienten abhängen. Aufgrund dieser Einschränkungen werden heute Serumuntersuchungen bezüglich der Antikörperkonzentrationen gegen verschiedene Nahrungsmittel-Panel zunehmend eingesetzt. Die beiden über das Immunsystem vermittelten Reaktionen unterscheiden sich insofern, als dass diese bei einer IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie innerhalb von einer Stunde nach der Nahrungsaufnahme stattfinden, und dass bei der IgG/IgG<sub>4</sub> Überempfindlichkeit eine verzögerte Reaktion 24 bis 120 Stunden nach dem Essen auftritt und es zu einer andauernden Symptomatik kommen kann.

## 3. TESTPRINZIP

Der Demeditec IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA). In den Vertiefungen von einer Mikrotiterplatte (pro Patient) sind 88 verschiedene Antigene und 8x Referenzantigen (Eiklar) gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards oder Kontrollen werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgG<sub>4</sub> Antikörpern aus dem Serum und den immobilisierten Antigenen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nicht-gebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgG<sub>4</sub>-AP Konjugat zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (PNPP) pipettiert und 60 Minuten bei 37°C inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein gelber Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen. Die Konzentration der IgG<sub>4</sub> Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.



#### 4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

#### 5. INHALT DES TESTBESTECKS

Der IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA enthält Reagenzien für einen Patienten (88 Bestimmungen). Auf dem ersten Steifen der Platte befindet sich Referenzantigen (Eiklar, f01) zur Erstellung einer Standardkurve und der Austestung von Kontrollen.

Symbol	Komponenten	Volumen / Menge
<b>SORB</b> <b>MT</b>	Nahrungsmittel- /Referenzantigen beschichtete Mikrotiterplatte	1
<b>CAL</b> <b>A – F</b>	Standards: 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50, 100 U/mL	je 0,5 mL
<b>CONTROL</b> <b>low &amp; high</b>	Kontrollen: schwach positiv, stark positiv	je 0,5 mL
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b>	Anti-human-IgG <sub>4</sub> -Enzymkonjugat	15 mL
<b>SUB</b> <b>PNPP</b>	Substratlösung	15 mL
<b>STOP</b> <b>SOLN</b>	Stopp-Lösung	15 mL
<b>SAM</b> <b>DIL</b>	Probenverdünner	40 mL
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>10x</b>	Waschpuffer (10×)	60 mL

#### Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

**5.1. SORB MT Mikrotiterplatte**

1 Platte à 96 Vertiefungen, beschichtet mit 88 verschiedenen Nahrungsmittelantigenen und 8x Referenzantigen (1. Streifen, schwarz markiert). Belegungsplan siehe Anlage. Gebrauchsfertig.

**5.2. CAL A – F Standards A-F**

Je 0,5 mL, menschliches mit PBS/BSA verdünntes Plasma, mit 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50 und 100 U/mL an IgG<sub>4</sub> Antikörpern gegen Eiklar (f01). Zusatz von 0,05% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

**5.3. CONTROL low Schwach-positive Kontrolle**

0,5 mL, menschliches mit PBS/BSA verdünntes Plasma, enthält eine niedrige Konzentration an IgG<sub>4</sub> Antikörpern. Zusatz von 0,05% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

**5.4. CONTROL high Stark-positive Kontrolle**

0,5 mL, menschliches mit PBS/BSA verdünntes Plasma, enthält eine hohe Konzentration an IgG<sub>4</sub> Antikörpern. Zusatz von 0,05% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

**5.5. ENZ CONJ Anti-human-IgG<sub>4</sub>-Enzymkonjugat**

15 mL, Maus-anti-human-IgG<sub>4</sub>-AP, in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01% Methylisothiazolon, 0,01% Bromonitrodioxan und 5 mg/L Proclin™. Gebrauchsfertig.

**5.6. SUB PNPP Substratlösung**

15 mL, PNPP (Paranitrophenylphosphat). Gebrauchsfertig.

**5.7. STOP SOLN Stopp-Lösung**

15 mL, 1 M Natronlauge. Gebrauchsfertig.

**5.8. SAM DIL Probenverdünner**

40 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,05% Natriumazid. Gebrauchsfertig.

**5.9. WASH SOLN 10x Waschpuffer**

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

**6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL**

- 100 µL- und 1000 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (405 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendekel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

**7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN**

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 100 µL Serum + 10 mL Probenverdünner).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

### 8.1. Vorbereitung der Reagenzien

**Waschlösung:** vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt und die Kontrollen mitgetestet werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

### 8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für jeden zu testenden Patienten eine Mikrotiterplatte vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards und Kontrollen in die Vertiefungen gemäß Belegungsplan pipettieren.
3. Platte abdecken und 60 Minuten bei 37°C inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben.
6. Platte abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben.
9. Platte abdecken und 60 Minuten bei 37°C inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 405 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

## 9. AUSWERTUNG

Die Auswertung kann in Unit pro mL (U/mL) oder Klassen erfolgen.

### Beispiel

Standard	Klasse	Messwerte (OD)
0,35 U/mL	1	0,156
0,7 U/mL	2	0,212
3,5 U/mL	3	0,445
17,5 U/mL	4	1,035
50 U/mL	5	1,660
100 U/mL	6	2,569

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

### Quantitative Auswertung

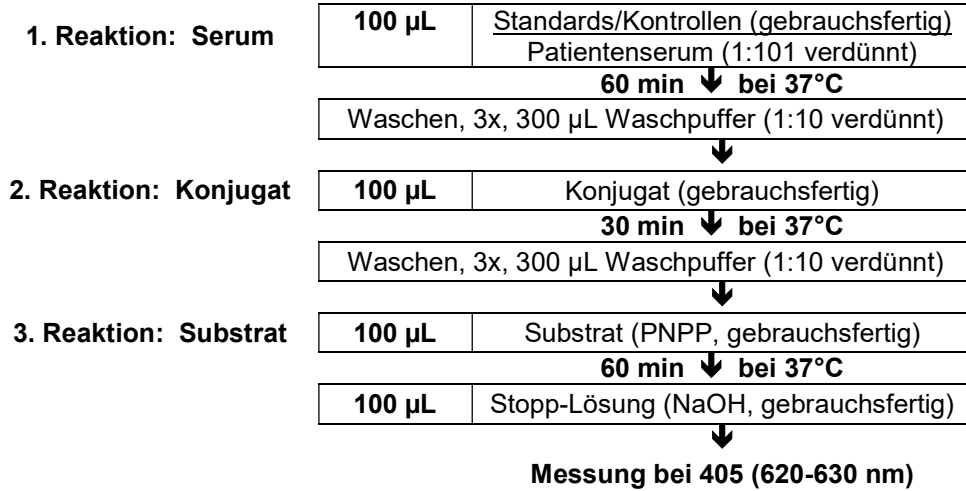
Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des IgG<sub>4</sub> Screen Nutritional 88 ELISA Test-Kits sind auf Units pro mL (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Die Werte für die Standards sind auf den Etiketten der Fläschchen angegeben. Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Standardkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis bzw. die Klasse abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

Spez. IgG <sub>4</sub> ELISA	Eiklar	Kuhmilch	Tomate
Intra-Assay-Präzision	7,7 %	8,0 %	8,7 %
Inter-Assay-Präzision	6,6 – 10,9 %	8,4 – 13,0 %	4,6 – 7,4 %
Inter-Lot-Präzision	2,5 – 11,4 %	5,6 – 11,8 %	0,5 – 9,6 %
Analytische Sensitivität	0,22 U/mL	0,17 U/mL	0,16 U/mL
Wiederfindung	90 – 107 %	89 – 103 %	87 – 97 %
Linearität	82 – 114 %	73 – 100 %	102 – 120 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen IgE bis 100.000 IU/mL.		
Interferenzen	Keine Interferenz mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL.		
Klinische Spezifität	88 %	86 %	90 %
Klinische Sensitivität	86 %	94 %	80 %

**11. LITERATUR**

1. Aas K: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. *Clinical Allergy* 1978; 8:39-50.
2. AMA Council on Scientific Affairs, In Vitro Testing for Allergy. Report II of the Allergy Panel Council on Scientific Affairs. *JAMA*, 1987, 258(12):1639-43.
3. AMA Council on Scientific Affairs, In Vivo Diagnostic Testing and Immunotherapy for Allergy. Part I, *JAMA*, 1987, 258:1363-7.
4. Bleumink E: Food Allergy; the chemical nature of the substance eliciting symptoms. *World Reviews in Nutrition and Diet* 1970; 12:505-570.
5. Bübl, R. Schön, B., Rakoski, J.: Allergenspezifische IgG-Antikörper bei Atopikern; *Allergologie* 16, 7, 299-304 (1993).
6. Canadian Paediatric Society, Allergy Section. Blood Tests for Allergy in Children. *Can Med Assoc J*, 1990, 142(11):1207-8.
7. Cohen, G.A., Hartmann, G., Hamburger, R.N., O'Connor, R.D.: Severe anemia and chronic bronchitis associated with a markedly elevated specific IgG to cow's milk protein; *Annals of Allergy* 55, 38-40 (1985).
8. Devey, M.E., Wilson, D.V., Wheeler, A.W.: The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay-fever patients during hyposensitization; *Clin. Allergy* 6, 227 (1976).
9. Durham, S.R., Lee, T.H., Cromwell, O., Shaw, R.J., Merret, T.G., Merret, J., Cooper, P, Kay, A.B.: Immunologie studies in allergen-induced late-phase asthmatic reactions; *J. Allergy Clin Immunol* 74, 49 (1984).
10. Djurup, R., Osterballe, O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapie; *Allergy* 39, 433-441(1984).
11. Rowntree, S., Platt-Mills, T.A.E, Cogswell, J.J, Mitchell E.B.: A subclass IgG<sub>4</sub>-specific antigen-binding Radioimmunoassay (RIA): Comparison between IgG and IgG<sub>4</sub> antibodies to food and inhaled antigens in adult atopic dermatitis after desensitization treatment and during development of antibody responses in children; *J. Allergy Clin. Immunol* 80, 622-630 (1987).
12. Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D.R., Smith, E., Fairburn, E.: Elevated serum IgG and IgG<sub>4</sub> in patients with atopic dermatitis; *Br. J. Derm*: 97, 59-63 (1977).
13. Wojdani, A., Etessami, S., Cheung, G.P.: IgG is not the only inhibitor of IgE in the RAST test; *Annals of Allergy* 55, 463-468 (1985).
14. Wüthrich, Brunello: Neurodermitis atopica (atopische Dermatitis) in Fuchs/Schulz, *Manuale Allergologicum* V, 14, 21-22.

**12. KURZANLEITUNG**

## 1. USO PREVISTO

La prueba IgG<sub>4</sub> Screen Nutricional 88 ELISA de Demeditec ha sido diseñada para la detección y la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos contra antígenos alimentarios en suero y plasma. Otras aplicaciones en otros fluidos corporales son posibles y pueden ser solicitadas al Servicio Técnico de Demeditec. Los resultados de laboratorio nunca pueden ser la única base de un informe médico. El historial del paciente y otras pruebas también deben tenerse en cuenta.

## 2. INFORMACIÓN GENERAL

Las reacciones de incompatibilidad contra los alimentos pueden causar una variedad de síntomas en el organismo humano, y esta alteración se manifiesta en el sistema inmune por la formación de anticuerpos específicos IgE, IgG o IgG<sub>4</sub>. Las estadísticas muestran que un 60% de la población sufre de intolerancia contra al menos un producto alimenticio, el cual puede causar síntomas clínicos o acentuarlos. Pueden haber diversos indicios que abarcan desde irritaciones en la piel, desordenes digestivos hasta migraña. Con los hallazgos diagnósticos inespecíficos de incomodidades, las alergias o intolerancias contra los alimentos deberían ser aclaradas. La base teórica para la determinación de IgG o IgG<sub>4</sub> específicas para el diagnóstico de intolerancias a los alimentos dependen de la observación de algunas subclases de IgG (principalmente IgG<sub>4</sub>) que están conectadas a la desgranulación in vitro de los basófilos y mastocitos y a la activación de la cascada del complemento. También se han observado altas concentraciones de IgG medidas en personas atópicas. Las primeras encuestas mostraron personas con reacciones inflamatorias contra la IgG de alimentos pero no se detectó IgE. También se encontraron títulos significativamente aumentados de IgG e IgG<sub>4</sub> en pacientes con intolerancias alimentarias. Las pruebas cutáneas tienen una correlación relativamente baja con las alergias alimentarias y solo son significativas en presencia de reacciones relacionadas con IgE. Como herramientas adicionales de diagnóstico se aplican dietas de provocación y eliminación. Estos métodos dependen fuertemente de la motivación y el cumplimiento del paciente. Debido a estas restricciones, actualmente las determinaciones serológicas de anticuerpos contra diversos paneles de alimentos se aplican cada vez más. Las dos reacciones relacionadas con el sistema inmune difieren en cuanto a que la alergia alimentaria asociada a IgE ocurre dentro de la siguiente hora después de la ingesta de alimentos, mientras que las intolerancias IgG / IgG<sub>4</sub> muestran una reacción tardía de 24 a 120 horas y pueden surgir síntomas persistentes.

## 3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba IgG<sub>4</sub> Screen Nutricional 88 ELISA de Demeditec se basa en el principio de inmunoensayo enzimático (EIA, por sus siglas en inglés). 88 antígenos de alimentos diferentes y 8x antígenos de referencia (clara de huevo) para estándares y controles se unen a la superficie de las tiras de microtitulación. El suero del paciente diluido o los calibradores y controles listos para usar se pipetea en los pocillos de la microplaca. Se produce una unión entre los anticuerpos IgG<sub>4</sub> del suero y los antígenos inmovilizados. Después de una (1) hora de incubación a 37°C, la placa se enjuaga con solución de lavado diluida, para eliminar el material no unido. A continuación, se agrega el conjugado IgG<sub>4</sub>-AP antihumano listo para usar y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Después de otra etapa de lavado, la solución de sustrato (PNPP) se pipetea e incuba durante 60 minutos a 37°C, lo que induce el desarrollo de un tinte amarillo en los pocillos. El desarrollo del color se termina con la adición de una solución de parada. La coloración resultante se mide espectrofotométricamente a la longitud de onda de 405 nm. La concentración de los anticuerpos IgG<sub>4</sub> es directamente proporcional a la intensidad del color.

#### 4. LIMITACIONES, PRECAUCIONES Y COMENTARIOS GENERALES

- ¡Solo para uso *in vitro*! ¡No ingerir o tragar! Deben seguirse las precauciones habituales de seguridad en el laboratorio, así como la prohibición de comer, beber y fumar.
- Todos los sueros y plasmas o tampones, se han probado con respecto a HBsAg, VIH y VHC con métodos reconocidos y se encontraron negativos. Sin embargo deben tomarse precauciones como el uso de guantes de látex.
- Los derrames de suero y de reactivo deben eliminarse con una solución desinfectante (por ejemplo, hipoclorito de sodio, 5%) y deben desecharse adecuadamente.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18 a 25°C) antes de la realización de la prueba.
- Antes de pipetear, todos los reactivos deben ser mezclados, inclinando o balanceando suavemente. Debe evitarse una agitación vigorosa con formación de espuma.
- Es importante pipetear con intervalos constantes, de modo que todos los pocillos de la microplaca estén en las mismas condiciones.
- Al retirar reactivos de las botellas, debe tenerse cuidado de que los tapones no estén contaminados. Además, debe evitarse una posible confusión. El contenido de las botellas usualmente es sensible a la oxidación, por ello deberían estar abiertos solo por corto tiempo.
- Para evitar un arrastre o una contaminación cruzada, se deben usar puntas de pipeta desechables separadas.
- Todos los reactivos deben ser usados dentro de su periodo de vencimiento / validez.
- De acuerdo con la Buena Práctica de Laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés) o siguiendo ISO9001, todos los dispositivos de laboratorio empleados deben controlarse regularmente con respecto a la exactitud y precisión. Esto se refiere, entre otros, a la pipeta de microlitros y a la instrumentación de lavado o lectura (ELISA-Reader).
- Debe evitarse el contacto de ciertos reactivos, sobre todo la solución de parada y el sustrato, con la piel, los ojos y mucosas, ya que podrían producirse irritaciones y quemaduras por ácido, y existe el peligro de intoxicación.

#### 5. REACTIVOS SUMINISTRADOS

La prueba IgG<sub>4</sub> Screen Nutricional 88 ELISA de Demeditec contiene reactivos suficientes para un (1) paciente (88 determinaciones). La primera tira de la microplaca contiene antígenos de referencia (clara de huevo, f01) para la generación de una curva de calibración y la determinación de controles.

Símbolo	Componentes	Volumen / Cantidad
<b>SORB</b> <b>MT</b>	Alimento / Referencia placa de microtitulación recubierta de antígeno	1
<b>CAL</b> <b>A</b> - <b>F</b>	Estándares: 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50, 100 U/mL	0.5 mL cada uno
<b>CONTROL</b> <b>low</b> & <b>high</b>	Controles: positivo débil, positivo fuerte	0.5 mL cada uno
<b>ENZ</b> <b>CONJ</b>	Conjugado enzimático anti-humano IgG <sub>4</sub>	15 mL
<b>SUB</b> <b>PNPP</b>	Sustrato	15 mL
<b>STOP</b> <b>SOLN</b>	Solución de Parada	15 mL
<b>SAM</b> <b>DIL</b>	Diluyente de muestra	40 mL
<b>WASH</b> <b>SOLN</b> <b>10x</b>	Tampón de lavado (10x)	60 mL

**Almacenamiento y Estabilidad** (consulte la fecha de vencimiento en la etiqueta de la caja externa)  
Almacene los componentes de la prueba de 2 - 8°C y no los use después de la fecha de caducidad en la etiqueta externa de la caja. Antes de usar, todos los componentes deben estar a temperatura ambiente (18-25°C). Después del uso, la placa debe volverse a sellar, las tapas de las botellas deben reemplazarse y ajustarse y la prueba debe almacenarse a 2-8°C. Después de la primera apertura, la prueba debe usarse dentro de los 3 meses, el tampón de lavado diluido, puede conservarse durante 4 semanas a 2 - 8°C.



**5.1. [SORB] [MT] Microplaca**

1 microplaca, recubierta con 88 antígenos de alimentos (ver esquema de distribución) y 8x antígenos de referencia (1. tira, código de color negro). Listo para usar.

**5.2. [CAL] [A] – [F] Estándar A-F**

6 x 0.5 mL, plasma humano diluido con PBS/BSA, con 0.35, 0.70, 3.5, 17.5, 50 y 100 U/mL de anticuerpos contra clara de huevo (f1) IgG<sub>4</sub>. Adición de 0,05% de azida de sodio. Listo para usar.

**5.3. [CONTROL] [low] Control Positivo débil**

0.5 mL, plasma humano diluido con PBS/BSA, incluyendo bajas concentraciones de anticuerpos IgG<sub>4</sub>. Adición de 0.05% de azida de sodio. Listo para usar.

**5.4. [CONTROL] [high] Control Positivo fuerte**

0.5 mL, plasma humano diluido con PBS/BSA, incluyendo altas concentraciones de anticuerpos IgG<sub>4</sub>. Adición de 0.05% de azida de sodio. Listo para usar.

**5.5. [ENZ] [CONJ] Conjugado Enzimático IgG Anti-Humano**

15 mL, IgG<sub>4</sub>-AP de ratón, en solución tampón proteica. Adición de 0,01% de metilisotiazolinona, 0,01% de bromo nitro dioxano y 5 mg /L de Proclin™. Listo para usar.

**5.6. [SUB] [PNPP] Sustrato**

15 mL, PNPP (Paranitrofenilfosfato). Listo para usar.

**5.7. [STOP] [SOLN] Solución de Parada**

15 mL, 1 M hidróxido de sodio. Listo para usar.

**5.8. [SAM] [DIL] Diluyente de Muestras**

40 mL, tampón PBS/BSA. Adición de 0.05% azida de sodio. Listo para usar.

**5.9. [WASH] [SOLN] [10x] Tampón de Lavado**

60 mL, PBS + Tween 20, concentrado 10x. Concentración final: diluido 1+9 con agua desionizada. Si durante el almacenamiento en frío precipitan los cristales, el concentrado debe calentarse a 37°C durante 15 minutos.

**6. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS**

- Micro pipetas multicanal de 100 µL y 1000 µL
- Lector de microplaca (405 nm)
- Lavador de microplaca
- Tubos reactivos para la dilución del suero
- Agua desionizada
- Tapa negra reutilizable para cubrir (disponibles para pedidos en Demeditec Diagnostics GmbH)

**7. RECOLECCIÓN Y MANEJO DEL ESPECIMEN (MUESTRA)**

Principalmente, suero o plasma (EDTA, heparina) se puede usar para la determinación. El suero se separa de la sangre que se extrae de forma aséptica mediante venopunción, después de la coagulación y la centrifugación. Los especímenes (muestras) de suero o plasma pueden ser almacenados refrigerados (2 – 8°C) hasta por siete (7) días. Para un almacenamiento más largo se debe mantener a - 20°C. Los especímenes no deben ser congelados y descongelado repetidamente. Las muestras contaminadas por lípidos, hemolíticos o bacterias pueden causar resultados falsos positivos o falsos negativos. Para la realización de la prueba, las muestras (no los estándares) serán diluidas 1:101 con el diluyente de muestra listo para usar (ej. 100 µL suero 9+10 mL de diluyente de muestra).

## 8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### 8.1. Preparación de Reactivos

**Solución de lavado:** diluir antes de usar 1 + 9 con agua desionizada. Si durante el almacenamiento en frío precipitan los cristales, el concentrado debe calentarse a 37 °C durante 15 minutos.

- Se recomienda la estricta observancia del protocolo para un rendimiento confiable. Cualquier cambio o modificación son responsabilidad del usuario.
- Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso, pero no deben dejarse a esta temperatura más tiempo de lo necesario.
- Se debe establecer una curva estándar con cada ensayo.
- Devuelva las tiras de microtitulación no utilizadas a la bolsa de plástico y guárdelas secas a 2-8°C.

### 8.2. Pasos del ensayo

1. Para cada muestra de paciente prepare una microplaca.
2. Pipetee 100 µL de cada una de las muestras diluidas, (1:101) estándares y controles listos para usar respectivamente, en los pozos (consulte el esquema de distribución).
3. Cubra la placa e incube por 60 minutos a 37°C.
4. Vacíe los pocillos de la placa (volcar o aspirar) y añada 300 µL de solución de lavado diluida. Este proceso se repetirá un total de tres veces. Los restos del tampón de lavado se eliminan golpeando suavemente la microplaca sobre una toalla de papel tisú.
5. Pipetee 100 µL de cada conjugado listo para usar, en los pozos.
6. Cubra la placa e incube por 30 minutos a 37°C.
7. Vacíe los pocillos de la placa (volcar o aspirar) y añada 300 µL de solución de lavado diluida. Este proceso se repetirá un total de tres veces. Los restos del tampón de lavado se eliminan golpeando suavemente la microplaca sobre una toalla de papel tisú.
8. Pipetee 100 µL de cada sustrato listo para usar, en los pozos.
9. Cubra la placa e incube por 60 minutos a 37°C.
10. Para finalizar la reacción del sustrato, pipetee 100 µL de cada solución de parada, lista para usar, en los pocillos.
11. Después de mezclar bien y limpiar el fondo de la placa, realice la lectura de la absorbancia a 405 nm (opcionalmente, longitud de onda de referencia de 620 nm). El color es estable por al menos 60 minutos.

## 9. EVALUACIÓN

La evaluación puede realizarse en unidades por ml (U/ml) o en clases.

### Ejemplo

Estándar	Clase	Valor OD
0.35 U/mL	1	0.156
0.7 U/mL	2	0.212
3.5 U/mL	3	0.445
17.5 U/mL	4	1.035
50 U/mL	5	1.660
100 U/mL	6	2.569

La tabla anterior contiene solo un ejemplo, que se logró bajo condiciones arbitrarias de temperatura y ambiente. Los datos descritos no constituyen en consecuencia valores de referencia que deban encontrarse en otros laboratorios de la misma manera.

### Evaluación Cuantitativa

Los estándares y controles listos para usar de la prueba IgG<sub>4</sub> Screen Nutricional 88 ELISA se definen y expresan en unidades arbitrarias (U / ml). Esto da como resultado una evaluación cuantitativa exacta y reproducible. Los valores para estándares y controles, en unidades, están impresos en las etiquetas de los viales. Para una evaluación cuantitativa, las absorbancias de los calibradores se dibujan en *gráficas punto a punto* frente a sus concentraciones. A partir de la curva de referencia resultante, los valores de concentración o la clase de reacción respectiva para los controles y cada muestra de paciente pueden extraerse luego en relación con sus absorbancias. También es posible usar programas de computadora automáticos. Como ajuste de curva se debe elegir *punto a punto*.









**10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

<b>Especificaciones IgG<sub>4</sub> ELISA</b>	<b>Clara de huevo</b>	<b>Leche de vaca</b>	<b>Tomate</b>
Precisión intra ensayo	7.7 %	8.0 %	8.7 %
Precisión inter ensayo	6.6 – 10.9 %	8.4 – 13.0 %	4.6 – 7.4 %
Precisión entre lotes	2.5 – 11.4 %	5.6 – 11.8 %	0.5 – 9.6 %
Sensibilidad analítica	0.22 U/mL	0.17 U/mL	0.16 U/mL
Recuperación	90 – 107 %	89 – 103 %	87 – 97 %
Linealidad	82 – 114 %	73 – 100 %	102 – 120 %
Reactividad cruzada	Sin reactividad cruzada hacia IgE hasta 100000 UI/mL		
Interferencias	Sin interferencias con bilirrubina hasta 0.3 mg/mL, hemoglobina hasta 8.0 mg/mL y triglicéridos hasta 5.0 mg/mL.		
Especificidad clínica	88 %	86 %	90 %
Sensibilidad clínica	86 %	94 %	80 %

**11. REFERENCIAS**

1. Aas K: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. *Clinical Allergy* 1978; 8:39-50.
2. AMA Council on Scientific Affairs, In Vitro Testing for Allergy. Report II of the Allergy Panel Council on Scientific Affairs. *JAMA*, 1987, 258(12):1639-43.
3. AMA Council on Scientific Affairs, In Vivo Diagnostic Testing and Immunotherapy for Allergy. Part I, *JAMA*, 1987, 258:1363-7.
4. Bleumink E: Food Allergy; the chemical nature of the substance eliciting symptoms. *World Reviews in Nutrition and Diet* 1970; 12:505-570.
5. Bübl, R. Schön, B., Rakoski, J.: Allergenspezifische IgG-Antikörper bei Atopikern; *Allergologie* 16, 7, 299-304 (1993).
6. Canadian Paediatric Society, Allergy Section. Blood Tests for Allergy in Children. *Can Med Assoc J*, 1990, 142(11):1207-8.
7. Cohen, G.A., Hartmann, G., Hamburger, R.N., O'Connor, R.D.: Severe anemia and chronic bronchitis associated with a markedly elevated specific IgG to cow's milk protein; *Annals of Allergy* 55, 38-40 (1985).
8. Devey, M.E., Wilson, D.V., Wheeler, A.W.: The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay-fever patients during hyposensitization; *Clin. Allergy* 6, 227 (1976).
9. Durham, S.R., Lee, T.H., Cromwell, O., Shaw, R.J., Merret, T.G., Merret, J., Cooper, P, Kay, A.B.: Immunologic studies in allergen-induced late-phase asthmatic reactions; *J. Allergy Clin Immunol* 74, 49 (1984).
10. Djurup, R., Osterballe, O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapy; *Allergy* 39, 433-441(1984).
11. Rowntree, S., Platt-Mills, T.A.E, Cogswell, J.J, Mitchell E.B.: A subclass IgG<sub>4</sub>-specific antigen-binding Radioimmunoassay (RIA): Comparison between IgG and IgG<sub>4</sub> antibodies to food and inhaled antigens in adult atopic dermatitis after desensitization treatment and during development of antibody responses in children; *J.Allergy Clin. Immunol* 80, 622-630 (1987).
12. Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D.R., Smith, E., Fairburn, E.: Elevated serum IgG and IgG<sub>4</sub> in patients with atopic dermatitis; *Br. J. Derm.* 97, 59-63 (1977).
13. Wojdani, A., Eteessami, S., Cheung, G.P.: IgG is not the only inhibitor of IgE in the RAST test; *Annals of Allergy* 55, 463-468 (1985).
14. Wüthrich, Brunello: Neurodermitis atopica (atopische Dermatitis) in Fuchs/Schulz, *Manuale Allergologicum* V, 14, 21-22.

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta