

INTERNATIONALE VERSION

Allerquant™ IgG-ELISA-Testkit für intollerante 90 Nahrungsmittel

REF 7190

Für die semi-quantitative Analyse von Antikörpern
gegen 90 Nahrungsmittelallergene
in Humanserum

november 2014



I. VERWENDUNGSZWECK

Der *Allerquant 90G IgG-ELISA-Test* dient der Messung der relativen Menge nahrungsmittelspezifischer IgG-Antikörper in humanem Serum. Die Messwerte sind stets in Zusammenhang mit dem klinischen Bild zu betrachten, da die Überhöhung eines bestimmten nahrungsmittelspezifischen Antikörpers allein nicht notwendigerweise auf eine Erkrankung schließen lässt. Dieses Testverfahren liefert keine Informationen bezüglich IgE-vermittelter Allergien.

II. HINTERGRUND

Seit mehreren Jahren stößt das Thema der Nahrungsmittelunverträglichkeit sowie die Bedeutung von Nahrungsmitteln und Zusatzstoffen als ursächliche Faktoren für eine Überempfindlichkeit gegenüber Nahrungsmitteln auf beträchtliches Interesse. Zu den häufig in diesem Kontext erwähnten Nahrungsmitteln gehören Kuhmilch, Eier, Weizen, Mais, Schokolade, Nüsse, Sojabohnen und Schalentiere. Etwa 0,5% der Säuglinge reagieren überempfindlich auf Kuhmilch. Studien legen nahe, dass die Wahrscheinlichkeit, dass jüngere Geschwister eines Kindes mit nachgewiesener Nahrungsmittelallergie ebenfalls eine solche Überempfindlichkeit aufweisen, um bis zu 50% höher ist. Den meisten Nahrungsmitteln einer bestimmten Gruppe sind oftmals dieselben allergenen Eigenschaften zu eigen. In manchen Fällen treten auch allergische Kreuzreaktionen zwischen zwei Gruppen auf. Um bestimmte Überempfindlichkeitsreaktionen zu begrenzen, werden gekochte Nahrungsmittel empfohlen, die häufig weniger allergen als rohe Nahrungsmittel sind.

Die häufigsten Symptome einer Nahrungsmittelunverträglichkeit, wie Übelkeit, Durchfall und Bauchschmerzen, betreffen den Magen-Darm-Bereich. Zu den klinischen Manifestationen einer Nahrungsmittelunverträglichkeit gehören auch die klassischen allergischen Symptome wie anaphylaktischer Schock, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis und Urtikaria. Die Rolle, die Nahrungsmittelunverträglichkeit bei Beschwerden wie Migräne sowie allergischen Spannungs- und Erschöpfungszuständen spielen, wird kontrovers

diskutiert. Es ist wichtig zu bedenken, dass die Symptome einer Nahrungsmittelunverträglichkeit, insbesondere die gastrointestinalen Symptome, auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen auftreten können.

III. TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden mit spezifischen Allergenen separat beschichtet. Die Allergene können so mit spezifischen, im Patientenserum vorhandenen Antikörpern reagieren. Überschüssige Serumproteine werden durch den Waschschrift entfernt. Enzymkonjugat kann mit dem Allergen-Antikörper-Komplex reagieren. Durch Zugabe eines Substrats, das mit dem gebundenen Enzym reagiert, kommt es zu einer Einfärbung der Lösung. Die Farbintensität wird gemessen. Sie steht in direktem Verhältnis zu der Konzentration an IgG-Antikörpern, die für ein bestimmtes Allergen spezifisch sind.

IV. REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Dieses Testkit enthält genügend Mikrotiterplatten und Reagenzien, um 3 Patientensera auf Antikörper gegen 90 verschiedene Lebensmittel zu untersuchen.

PLA FOOD = Lebensmittelextrakt-beschichtete
Mikrotiterplatten 3 Platten
DIL SPE 1X = Probenverdünnungspuffer (Grün) 1 x 56 ml
BUF WASH 66.67X = Waschpuffer (Konzentrat) 1 x 30 ml
CAL FOOD IgG = Lebensmittel-IgG-Kalibrator 1,0 ml
CTRL + IgG = Lebensmittel-IgG-Positivkontrolle 1,0 ml
CONJ ENZ IgG-HRP = Lebensmittel-IgG-HRP-Konjugat 1 x 40 ml
SUBS A TMB = Substratlösung A (TMB) 2 x 12 ml
SUBS B H2O2 = Substratlösung B (Wasserstoffperoxid) 2 x 12 ml
SOLN STOPPING = Stopplösung (1N H₂SO₄) 1 x 20 ml

V. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Material mit möglicher Gesundheitsgefährdung

Die Quelle der Kalibratoren und Kontrollen ist humanem Serum. Die verwendeten Humanseren ergaben bei der Prüfung auf HbsAg bzw. Antikörper gegen HIV-1/2 und HCV mit von der amerikanischen Nahrungsmittel- und Drogenbehörde (FDA) lizenzierten Reagenzien ein negatives Ergebnis. Da es jedoch kein Testverfahren gibt, das das Vorhandensein von HIV, Hepatitis B Virus oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, sind die Reagenzien als potentiell infektiöses Material zu behandeln.

2. Natriumazid

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung dieser Materialien sind die speziellen Richtlinien zu beachten.

3. Stopplösung

Die Stopplösung besteht aus 1N H₂SO₄. Beim Umgang mit dieser starken Säure ist Vorsicht geboten. Sie kann Verätzungen verursachen und sollte nur mit Handschuhen angefasst werden. Empfehlenswert sind darüber hinaus Schutzkleidung und Schutzbrille, ein Einatmen ist zu vermeiden. Verschüttete Säure sollte zunächst mit Wasser verdünnt werden, bevor sie mit Papiertüchern aufgenommen wird.

VI. VORBEREITUNG DER PATIENTENPROBE

Patientenserum in einer Konzentration von 1:100 in Probenverdünnungspuffer verdünnen. 0,1 ml Patientenserum in 10 ml Probenverdünnungspuffer pipettieren.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND AUFBEWAHRUNG

- Waschpuffer:** Inhalt des Gefäßes mit destilliertem Wasser in einen 2000-ml-Glaskolben waschen und bis zur 2000-ml-Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen. Kolben mit "Verdünnter Waschpuffer" beschriften. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2°-8° C sechs Monate haltbar.
- Substratlösung:** Substratlösungen "A" und "B" 30 Minuten vor der Verwendung zu gleichen Teilen mischen (z.B. je 5 ml von "A" und "B" für jeden Patienten oder jede zu verwendende Platte). Nicht verwendetes Substratlösungsgemisch entsorgen. Die Verschlüsse auf den Lösungen dürfen nicht vertauscht werden! Erscheint das Substratlösungsgemisch vor der Verwendung blau eingefärbt, ist es zu entsorgen. Das Substratlösungsgemisch ist bei Raumtemperatur 60 Minuten haltbar.

VIII. TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien des Testkits sind vor der Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen.

- VORBEREITUNG DER KALIBRATIONSKURVE:** Vier Reagenzgläser (12 x 75 mm) mit 50, 100, 200 und 400 U/ml beschriften. Jeweils 150 µl Probenverdünnungspuffer in die vier Glasröhrchen pipettieren. 150 µl Lebensmittel-IgG-Kalibrator in das Reagenzglas mit der Aufschrift "400 U/ml" pipettieren. Mischen und 150 µl in das Glasröhrchen mit der Aufschrift "200 U/ml" pipettieren. Mischen und 150 µl in das Glasröhrchen mit der Aufschrift "100 U/ml" pipettieren. Mischen und 150 µl in das Glasröhrchen mit der Aufschrift "50 U/ml" pipettieren. In den Reagenzgläsern mit der Aufschrift "100 U/ml", "200 U/ml" und "400 U/ml" sollten sich jeweils 150 µl und im Reagenzglas "50 U/ml" 300 µl befinden. Dies ist die im Testverfahren zu verwendende Kalibrationskurve. Aus jedem dieser Glasröhrchen werden wie folgt je 100 µl auf die Mikrotiterplatte gegeben.

Aus Reagenzglas	In Vertiefung
50 U/ml	1B
100 U/ml	1C
200 U/ml	1D
400 U/ml	1E

- 100 µl Probenverdünnungspuffer in Vertiefung 1A und 100 µl Positivkontrolle in Vertiefung 1F pipettieren.
- 100 µl des verdünnten Patientenserums (**siehe oben: VI. Vorbereitung der Patientenprobe**) in alle anderen Vertiefungen pipettieren. In allen Vertiefungen sollten sich 100 µl Flüssigkeit befinden.

- Platten mit Haftklebefolie oder Plastikfolie abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.
- Nach einstündiger Inkubation alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 300 µl verdünntem Waschpuffer waschen (**siehe oben: VII. Vorbereitung der Reagenzien und Aufbewahrung**). Bei Verwendung eines automatischen Waschräts sind die Herstellerhinweise bezüglich eines Waschvorgangs mit drei Zyklen und einem Waschvolumen von 300 µl zu beachten.
- 100 µl Lebensmittel-IgG-HRP-Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
- Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.
- Platten erneut wie in Schritt 4 waschen.
- 100 µl verdünntes Substratlösungsgemisch in alle Vertiefungen pipettieren (**siehe oben: VII. Vorbereitung der Reagenzien und Aufbewahrung**).
- Platten abgedeckt und 10 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.
- 50 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren. (Die blaue Färbung schlägt nach Zugabe der Stopplösung in gelb um).
- Absorption für alle Vertiefungen bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät messen.

IX. BERECHNEN DER ERGEBNISSE

Automatisierte Methode

Verwenden Sie ein automatisiertes Regressionsprogramm, um die Daten zu reduzieren. Akzeptable Ergebnisse werden mit (1) „Kubischer Spline“, (2) „Punkt-zu-Punkt“ oder (3) „Quadratisch“ erzielt. Interpolieren Sie die Patientenwerte aus der Kalibrationskurve.

Manuelle Methode

- Ermitteln Sie den Absorptionsgrad für alle Kalibratoren und Kontrollen sowie für die Probe.
- Erstellen Sie eine Dosis-Wirkungs-Kurve, bei der der Absorptionsgrad für jeden Kalibrator in Abhängigkeit von der Konzentration des entsprechenden Kalibrators auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier aufgetragen wird. Ziehen Sie eine gerade Linie zwischen zwei benachbarten Punkten. Dieser mathematische Algorithmus wird oft als „Punkt-zu-Punkt“-Berechnung bezeichnet.
- Lesen Sie Probenkonzentrationen unmittelbar von der Kurve ab.

X. QUALITÄTSKONTROLLE

Gültige Testergebnisse liegen vor, wenn die folgenden Qualitätskontrollspezifikationen für die optische Dichte (OD) bei 450 nm erfüllt sind.

OD Vertief. 1A	< 0,2
OD Vertief. 1B	> 1,2 x OD 1A
OD Vertief. 1C	> 1,2 x OD 1B
OD Vertief. 1D	> 1,2 x OD 1C
OD Vertief. 1E	> 1,2 x OD 1D
Konzentration positiv bei	> 100 U/ml

XI. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Absorptionsmessungen sind nach Extrapolation als Biomerica U/ml für jedes Allergen bzw. jeden Extrakt wie folgt zu interpretieren.









MESSUNG	INTERPRETATION	
< 50 U/ml	Negativ	0
50 - 100 U/ml	Geringgradig intolerant	+1
100 - 200 U/ml	Mittelgradig intolerant	+2
> 200 U/ml	Hochgradig intolerant	+3

XII. LITERATUR

- All, M., et al. Serum concentration of allergy specific IgG antibodies in inhalant allergy. Effects of specific immunotherapy. **Amer. J Clin. Pathol.**, **80**, 290, 1983
- Farrel, M. Food allergy, in Manual of Allergy and Immunology, ed: **Lawlor, G.J. and Fischer, T.J.**, 1982
- El Rafei, A., Peter, S.M., Harris, N., Bellanti, J.A., Diagnostic value of IgG4 measurements in patients with food allergy. **Annals of Allergy**, **62**, 94-99, 1989
- Kanny, F.K., Moneret-Vautrùn, D.A., Flabbee, J., Beaudouin, E., Morisset, M., and Thevenin, F. Population study of food allergy in France, **Internal Medicine, Clinical Immunology and Allergology**, France, 2000
- Calkhoven, P.G., Aalbers, M., Koshte, V.L., Schilte, P.P.M., Yntema, J.L., Griffioen, R.W., Van Nierop, J.C., Oranje, A.P., and Allberse, R.C. Relationship between IgG1 and IgG4 antibodies to foods and the development of IgE antibodies to inhalant allergens. II. Increased levels of IgG antibodies to foods in children who subsequently develop IgE antibodies to inhalant allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, **21**, 99-107, 1991
- Pastorello, E.A., Stocchi, L., Pravettoni, V., Bigi, A., Schilke, M.L., Incorvaia, C. and Zanusi, C., Role of the elimination diet in adults with food allergy. **J Allergy Clin. Immunol**, **84**, 475-83 1989
- Bock, S. A critical evaluation of clinical trials in adverse reactions to foods in children. **J. Allergy Clin. Immunol.** July 1986
- Ali, M., Ramanarayanan, M.P., Nalebuff, D.J., Fadal, R.G. and Willoughby, J.W., Serum Concentrations of Allergen-specific IgG Antibodies in Inhalant Allergy: Effect of Specific Immunotherapy. **American Society of Clinical Pathologists**, 0002-9173/83/0900/0290, 1982
- Sampson, H. A. Role of immediate food hypersensitivity in the pathogenesis of atopic dermatitis. **J Allergy Clin. Immunol**, **71**, no5, pp. 473-480, 1983
- Hoffman, D.R., Immunochemical identification of the allergens in egg white. **J Allergy Clin. Immunol.**, **72**, no 5 pp. 481-486 1983
- Pichler, W.J., Stadler, B.M., Dalhinden, C., Pecoud, A.R., Frei, P.C., Schneider, C., and DeWeck, A.L. Progress in Allergy and Clinical Immunology, **Proceedings of the 13th Int'l Congress of Allergology and Clinical Immunology** pp.299-303
- Abdelnoor, A.M., Kobeissy, F., Farhat, D., Hadi, U., Circulating immune complexes and complement C3 and C4 levels in selected group of patients with rhinitis in Lebanon. **Clin Mol. Allergy**, 2 (1), 6, 2004

- Atkinson W, Sheldon TA, Shaath N, Whorwell PJ., Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. **Gut**. 2004 Oct;53(10):1459-64
 - Kalliomaki MA., Food allergy and irritable bowel syndrome. **Curr Opin Gastroenterol**. 2005 Nov;21(6):708-11.
 - Zuo XL, Li YQ, Li WJ, Guo YT, Lu XF, Li JM, Desmond PV. Alterations of food antigen-specific serum immunoglobulins G and E antibodies in patients with irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. **Clin Exp Allergy**. 2007 Jun;37(6):823-30.
 - Thabane, M., Simunovic, M. Akhtar-Danes, N., et al. An outbreak of acute bacterial gastroenteritis is associated with an increased incidence of irritable bowel syndrome in children. **Am J Gastroenterol**, **105**, 933-939, 2010
 - Saito YA., Petersen GM., Larson JL., et al. Familial Aggregation of Irritable Bowel Syndrome: A Family Case-Control Study. **Am J Gastroenterol**, **105**, 833-841, 2010
- Immunology, ed: Lawlor, G.J. and Fischer, T.J., 1982.

XIII. SIMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter Vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i> -Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.

XIV. BEZUGSNACHWEIS

Weitere Screening-Produkte für IgG-vermittelte Nahrungsmittelallergien können bei Biomerica in verschiedenen Konfigurationen erworben werden. Weitere Informationen zu diesen Testkonfigurationen sind beim Kundendienst erhältlich.

BESTELLUNGEN:



BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, California 92614 USA

2°C / 8°C





Phone: (949) 645-2111
FAX: (949) 553-1231
E-Mail: bmra@biomerica.com

67190-5_ger.doc

november 2014



according to IVDD 98/79/ EC
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Germany

Mikrotiterplatten-Übersicht für 90 Lebensmittel (1 Patient)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Probenverdünnungspuffer	Apfel	Butter	Cheddarkäse	Colanuss	Knoblauch	Salat, Eisbergsalat	Hafer	Pintobohne	Sardine	Erdbeere	Forelle
B	Kalibrator 1	Avocado	Kohl	Hühnerfleisch	Mais	Ziegenmilch	Zitrone	Olive	Ananas	Jakobsmuschel	Stangenbohne	Thunfisch
C	Kalibrator 2	Banane	Rohrzucker	Peperoni	Käse (Hüttenkäse)	Weintraube, weiß/dunkel	Limabohne	Zwiebel	Schweinefleisch	Sesam	Sonnenblum Enkerne	Putenfleisch
D	Kalibrator 3	Gerste, volles Korn	Honigmelone (Cantaloupe)	Schokolade	Kuhmilch	Grapefruit	Hummer	Apfelsine	Kartoffel	Garnele	Süßkartoffel	Schwarze Walnuss
E	Kalibrator 4	Rindfleisch	Möhre	Zimt	Krabbe	Grüne Erbsen	Malz	Auster	Reis	Seezunge	Schweizer Käse	Weizen
F	Positiv-Kontrolle	Heidelbeere	Cashewnuss	Venusmuschel	Gurke	Grüne Paprika	Hirse	Petersilie	Roggen	Sojabohne	Schwarzer Tee	Bäckerhefe
G	Mandel	Brokkoli	Blumenkohl	Kabeljau	Ei (Eiweiß/Eigelb)	Heilbutt	Pilze	Pfirsich	Saflorsamen	Spinat	Tabak	Brauereihefe
H	Käse (Amerikanischer Käse, Weichkäse)	Buchweizen	Sellerie	Kaffee	Aubergine	Honig	Senfsaat	Erdnuss	Lachs	Kürbis	Tomate	Joghurt

november 2014 7190