Polycheck
CANIS

Polycheck Allergie NF Veterinär-Panel (Hund)

Testprinzip

Dieser neuartige *in vitro* Test zur Bestimmung von Allergen-spezifischem IgE in Serum basiert auf einem Immunoassayprinzip mit auf einer Membran aufgetragenen Allergenen und der Anwendung von **biotinylierten monoklonalen Antikörpern** gegen Hunde- IgE. Während des ersten Inkubationsschrittes mit dem Serum binden die allergen-spezifischen IgE-Moleküle an die entsprechenden Allergene. Im Anschluß an einen Waschschritt detektieren die biotinylierten Antikörper das gebundene IgE und reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat. Nach dem Waschen und der Zugabe eines Substrates [5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-1-Phosphat/Nitroblaues Tetrazolium (BCIP/NBT)] entsteht durch die enzymatische Aktivität der Phosphatase ein farbiges Präzipitat. Die Menge des Präzipitats ist direkt proportional zur Konzentration des spezifischen IgE im untersuchten Serum.

Vorteile dieses Verfahrens sind die Bestimmung von 20 Allergenen in nur einem Testansatz mit der geringen Menge von nur 0,2ml Serum, eine individuelle Standardkurve und eine hohe Sensitivität aufgrund der hohen Konzentration der Allergene, die in Form von dünnen Linien auf der Membran aufgebracht sind.

Im Testkit enthaltene Reagenzien

Alle ungeöffneten Reagenzien sind bei sachgerechter Lagerung (2-8°C) bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar.

- *Polycheck Allergie* Cassettes (24 Cassettes):
  Jede Membran ist mit 20 Allergenen und 5 Standards beschichtet.
- Starter (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use)
  gepufferte Proteinlösung
- Nachweisantikörper (1 Fläschchen,7 ml, ready to use):
  Biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen Hunde-IgE in einer Proteinlösung.
- Streptavidinkonjugat (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use):
  Streptavidin konjugiert mit Alkalischer Phosphatase.
- BCIP/NBT Substratlösung (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use):
  5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-1-Phosphat/Nitroblaues Tetrazolium als Substrat für die Alkalische Phosphatase.
- Waschpuffer (1 Päckchen):
  Trockenpulver aus Puffer + Additiven zum Waschen der Membran.

Nicht im Lieferumfang enthaltene erforderliche Materialien

- Pipette (200 - 1000 µl)
- Kippschüttler und auf Wunsch spezielle Bearbeitungsgeräte (beim Hersteller erhältlich)
- Computer mit Scanner und spezieller Software (beim Hersteller erhältlich)

Vorsichtsmaßnahmen

- Reagenzien aus verschiedenen Lots dürfen nicht gemischt werden.
- Lösungen nicht mit dem Mund pipettieren.
- Alle empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen für die Handhabung von potentiell infektiösem Material sollten beachtet werden.

Test-Verfahren

Allgemeines:

- Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
- Test ohne Unterbrechung durchführen.
- Trägermembran während des Test nicht austrocknen lassen!
- Aufbringen der Reagenzien im Bereich der Lücke, zwischen Membran und Cassettewanne.

1. Cassette kurz mit Waschpuffer befeuchten und auf Papiertüchern ausklopfen.
2. Die Membran kurz vor Aufbringen der Probe mit **250 µl Starterlösung** überschichten und **5 Minuten** inkubieren. Auf Papiertüchern vorsichtig ausklopfen.
3. **200 µl Serum** direkt nach dem Anfeuchten in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. Probe ablaufen lassen, die Membran *3 mal mit ca. 1 ml Waschpuffer liegend waschen (ca. 1 ml Waschpuffer entspricht einer gut gefüllten Cassettewanne)*; anschließend gut auf Papiertüchern ausklopfen.
4. **250 µl Waschpuffer** in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **5 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. *Membran wie in Schritt 3 beschrieben waschen.*
5. **250 µl Nachweisantikörper** in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **90 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. *Membran wie in Schritt 3 beschrieben waschen.*
6. **250 µl Streptavidin-Konjugat** in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. *Membran wie in Schritt 3 beschrieben waschen.*
7. **250 µl Substratlösung (BCIP/NBT)** in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **Im Dunkeln** (i.e. Abdecken mit Alufolie oder durch lichtundurchlässigen Deckel) **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. *Membran wie in Schritt 3 beschrieben waschen.*
   (Gesamtzeit 200 Minuten)
8. **Membran gut trocknen lassen** und den Cassette wie unten beschrieben auswerten.

Berechnung der Ergebnisse

Mit Hilfe eines Computers mit Scanner und einer speziellen Software werden die Ergebnisse berechnet:
Die Cassettes werden auf den Flachbettscanners aufgelegt, eingelesen und dokumentiert. Ein spezielles Programm analysiert und berechnet die Bilddaten. Im Vergleich zur Standardkurve wird die Menge des Allergen-spezifischen IgE für jedes Allergen als Kiloeinheiten pro Liter (kU/l) angegeben (vgl. Tabelle 1)

Tab. 1 Die 5 Klassen allergischer Reaktionen

IgE-Konzentration (kU/l)	Klasse
< 0.5	0
0.5 – 2.0	1
2.0 – 20	2
> 20	3,4

Allergen Panel

Das Polycheck-Veterinärpanel enthält 15 Einzelallergene und fünf Mischungen:

- Pollen
- Hausstaubmilben
- Vorratsmilben
- Schimmelpilze
- Malassezia
- Floh

Floh (Ctenocephalides)
Tyrophagus
Acarus siro
Sauerampfer
Beifuß
Spitzwegerich
Weißer Gänsefuß
Brennessel
6-Gräsermischung
Roggenpollen
Parietaria-Pollen
Platanen-/Weiden-/Pappelpollen
Birken-/Erlen-/Haselpollen
Ambrosia
Alt.tenuis/Clad.herbarum
Asp.fumigatus/Pen.notatum
Lepidoglyphus destructor
Malassezia
D.pteronyssinus
D.farinae

Standard 1 – 5

imovet bg Laupenstraße 33 CH-3008 Bern Schweiz
Tel: +41 (0)31 381 4725 Fax: +41 (0)31 381 3414
www.imovet-biocheck.com

Biocheck GmbH Vorbergweg 41 D-48159 Münster Deutschland
Tel: +49 (0)251 2150 869 Fax: +49 (0)251 2150 870
email: office@polycheck.de