



Polycheck  
EQUUS

## Polycheck Allergie NF Veterinär-Panel (Pferd)

### 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 vom **monoklonalen Antikörper** gegen Pferde - IgE. Während des ersten Inkubationsschrittes mit dem Serum binden die allergen-spezifischen IgE-Moleküle an die entsprechenden Allergene. Im Anschluß an einen Waschschrift detektiert der Antikörper das gebundene IgE. Ein zweiter spezifischer Antikörper markiert die gebundenen monoklonalen Antikörper und reagiert 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 Allergenpräparationen in nur einem Testansatz mit der geringen Menge von nur 0,25ml 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 Allergenpräparationen und 5 Standards beschichtet.
- Starter (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use)  
gepufferte Proteinlösung
- 1. Nachweisantikörper (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use):  
Monoklonaler Antikörper gegen Pferde-IgE in einer Proteinlösung.
- 2. Nachweisantikörper (1 Fläschchen, 7 ml, ready to use):  
Antikörper gegen Mäuse-IgG 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. **250 µl Serum** direkt nach dem Anfeuchten in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **90 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 1. 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 2. Nachweisantikörper** in die Vertiefung neben die Membran pipettieren. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren, dabei konstant mit ca. 30 rpm schütteln. *Membran wie in Schritt 3 beschrieben waschen.*
7. **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.*
8. **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 290 Minuten)

**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 Flachbettscannern 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
< 1.0	0
1.0 – 2.0	1
2.0 – 20	2
> 20	3,4

## Allergen Panel

Das Polycheck-Veterinärpanel enthält 15 Einzelallergene und fünf Mischungen:

- Pollen
- Insekten
- Hausstaubmilben
- Vorratsmilben
- Schimmelpilze



Tyrophagus  
Acarus siro  
Stechfliege (Stomoxys calcitrans)  
Kriebelmücke (Simulium)  
Mosquito (Salt Marsh Culicidae)  
Gnitze (Culicoides nubeculosus)  
Bremse (Tabanus)  
Raps  
Beifuß  
Spitzwegerich  
6-Gräsermischung  
Roggenpollen  
Platanen-/Weiden-/Pappelpollen  
Birken-/Erlen-/Haselpollen  
Ambrosia  
Micropolyspora faeni/Thermoactinomyces  
Asp.fumigatus/Pen.notatum  
Lepidoglyphus destructor  
D.pteronyssinus  
D.farinae

Standard 1 – 5