

5 Food IgG Screen ELISA Kit

stanovení IgG protilátek proti kravskému mléku,
pšenici, ořechům, bílkovinám bílé ryby a sóji
Kat. číslo GD109

Souprava je určena pouze pro *in-vitro* diagnostiku.

010703

Použití

Souprava je určena pro vyšetření intolerance pacienta na potraviny. Představuje rychlou vyšetřovací metodu pro stanovení hladiny IgG protilátek proti kravskému mléku, pšenici, směsi ořechů, masu bílých ryb a sóji v lidském krevním séru/plazmě. Soupravou lze vyšetřit až 12 pacientů. Výsledky musí být vždy uvedeny do korelace s klinickým stavem pacienta, neboť ani zvýšená hladina protilátek IgG proti potravině se nemusí vždy projevit jako syndrom. Výsledky tohoto testu nepodávají žádné informace o případné alergii vyvolané IgE.

Úvod

Někteří lidé vykazují chronické reakce na určité potravinové antigeny. Na rozdíl od okamžitého efektu alergie zprostředkované IgE, se reakce citlivosti na potraviny zprostředkovaná IgG může objevovat i po několika dnech.

S přecitlivělostí na určité druhy potravin mohou být spojeny následující syndromy: celková otupělost, přibírání na váze, dermatitida, artritida, chronická únava a střevní potíže. Pacientův stav může velmi zlepšit cílené odstranění alergizujících potravin z jeho jídelníčku.

Princip testu

Souprava využívá mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Na jejich povrchu jsou nanášeny extrakty antigenů kravského mléka, pšenice, směsi ořechů, bílé ryby a sóji. Do jamek se přidá vzorek krevního séra (zředěný v poměru 1 : 100) a inkubuje se dobu 30 minut. Na antigeny v jamkách se naváží protilátky specifické pro danou potravinu přítomné v testovaném vzorku.

Po promytí destičky se specificky navázané protilátky detekují pomocí specifického konjugátu (králičího anti-lidské IgG a peroxidázy). Po 30-minutové inkubaci je nenavázaný konjugát odstraněn promytím. Přidá se TMB substrát. V jamkách, ve kterých jsou přítomny protilátky specifické pro danou potravinu, se objeví modré zbarvení, které se po přidání stop-roztoku změní na žluté. Intenzita zbarvení žlutého roztoku se pak měří ELISA readerem s použitím filtrů o OD 450 nm a 620 nm.

Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** 12 stripů po 8 jamkách s předem nanesenými antigeny kravského mléka, pšenice, směsi ořechů, bílé ryby a sóji.
- **Reagens 1:** Ředící roztok vzorků, 15 ml, barva modrá, připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 2:** Koncentrovaný promývací roztok; před použitím naředte na 1200 ml.
- **Reagens 3:** Konjugát (roztok HRP-anti-IgG); 12 ml; barva červená; připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 4:** TMB substrát; 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 5:** Stop-roztok, 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Standardy IgG protilátek:** 0 a 25 U/ml; 1,5 ml od každého; připraveny k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek:** 1,5 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Návod k použití**

Další vybavení potřebné pro provedení testu

pipety 10µl, 100µl a 1000µl; multikanálová pipeta; ELISA reader s filtrem 450 nm, zařízení na promývání mikrotitračních destiček, destilovaná nebo deionizovaná voda, běžné laboratorní vybavení.

Skladování a bezpečnostní opatření

- Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Nepoužívejte soupravu po uplynutí data expirace.

- kalibrátor 25U/ml a pozitivní kontrolní vzorek jsou vyrobeny ze zředěného neinfekčního lidského krevního séra. Je však nutno dodržovat bezpečnostní postupy běžné v klinické laboratoři.
- Při manipulaci se sérem pacienta nebo s výrobky vyrobenými z krevního séra používejte vždy pracovní rukavice a ochranný oděv
- Stop roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou (pozor žiravina)

Vzorky

Vzorky krevní plazmy nebo séra by měly být dlouhodobě skladovány při teplotě -20°C. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testů.

Metodika

Než začnete pracovat, ujistěte se, že všechny materiály mají pokojovou teplotu.

Vzorek séra nebo plazmy musíte předředit v poměru 1 : 100. Zředte 10 µl séra do 1 ml ředícího roztoku (**Reagens 1**). Případně, zředte 20 µl krve v 1 ml roztoku na ředění vzorků.

Je velmi důležité dávkovat předředené vzorky i standardy do jamek bez jakékoli prodlevy. Pomalé dávkování nebo přestávky v postupu dávkování mohou způsobit zkreslení výsledků testu.

Stripy

Umístění a přehled antigenů navázaných v jamkách na stripu najdete dále v návodu. Pro každého pacienta je určen jeden strip. Nepoužité stripy uložte zpět do plastového sáčku s vysoušečem, můžete je použít později.

Standardy

Dávkujte 100µl každého standardu na do jamek A, B na stripu dle následujícího návodu:

Jamka	Standard U/ml
A	0
B	25

Pozitivní kontrolní vzorek

Dávkujte 100µl pozitivního kontrolního vzorku do jamky C.

Vzorky odebrané pacientovi

Dávkujte 100µl předředeného vzorku od pacienta do jamek D, E, F, G a H.

Mikrotitrační destičku inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**. Během všech inkubací se vyhybejte vystavení destičky slunečnímu světlu nebo přímému působení zdroje tepla.

Rozředte promývací pufr (**Reagens 2**) na obsah 1 200 ml.

Po inkubaci odsajte obsah jamek, a každou z nich pečlivě třikrát promyjte alespoň 350 µl promývacího pufru. Pečlivě promyťte je klíčem k dobrým výsledkům testu.

Osušte povrch mikrotitrační destičky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout. Okamžitě přidejte konjugát.**

Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Tento reagens je označen červeně. Nepoužívejte pro dávkování konjugátu a substrátu stejných špiček.

Mikrotitrační destičku inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**. Pak odsajte obsah jamek a každou z nich pečlivě čtyřikrát promyjte alespoň 350 µl promývacího pufru.

Osušte povrch mikrotitrační destičky savým papírem.
Nenechávejte jamky vyschnout. Okamžitě přidejte substrát.

Pomocí multikanálové pipety s čistými špičkami přidejte do každé jamky 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**).

Mikrotitrační destičku inkubujte po dobu **10 minut** a pak do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**). Abyste zajistili, že reakční doby budou pro všechny jamky stejné, měli byste stop-roztok dávkovat do jamek ve stejném pořadí v jakém jste do nich dávkovali TMB substrát.

Do deseti minut změňte intenzitu zabarvení ELISA readerem s filtrem 450 nm (alternativně 450 a 620 nm, duální vlnová délka). Žluté zabarvení je stabilní až jednu hodinu, pokud je destička uložena v temnu.

Výpočet výsledků

Naměřené hodnoty optické hustoty vyneste do grafu ve vztahu ke koncentracím. Vynesené body spojte přímkou. Z této čáry můžete vyčíst koncentraci protilátek IgG pro každý uvedený typ potraviny.

Interpretace výsledků

Výsledky tohoto testu se musí interpretovat v souvislostech s dalšími klinickými informacemi zjištěnými o každém z testovaných pacientů. Následující tabulka je jen pomůcka pro vaši lepší orientaci:

odpověď	třída	rozpětí (U/ml*)
normální		< 8
hraniční	(1+)	8 - 12.5
středně silná reakce	(2+)	12.5 - 25.0
pozitivní	(3+)	>25.0

*pracovní jednotky

Tato rozpětí jsou založena na omezeném výzkumu firmy 'Genesis Diagnostics' a uživatelé by si měli stanovit svá vlastní rozpětí.

Zabezpečení jakosti

Pozitivní kontrolní vzorek by měl vykazovat hodnoty vyšší než 25 U/ml.

Shrnutí metodiky

- Předřed'te sérum ředicím roztokem v poměru 1:100.
- Použijte jeden strip pro každého testovaného pacienta.
- Dávkujte 100µl standardů a předředěných vzorků.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- *Třikrát promyjte jamky.*
- Dávkujte 100 µl konjugátu do všech jamek (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- *Čtyřikrát promyjte jamky.*
- Dávkujte 100 µl TMB-substrátu do všech jamek (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Dávkujte 100 µl stop-roztoku do všech jamek (**Reagens 5**).
- Do 10 minut změňte optickou hustotu při **450 nm**.

Literatura

- James, M (1999) Nat Med J 2(4):7-15
 Henz, BM et al (1998) Exp Dermatol 7(4):139-42
 MacDonald, TT (1995) Clin Exp Allergy 25(S1):10-13
 Edwards, AM (1995) Clin Exp Allergy 25(S1):16-19
 Hirsch, C (1995) Health News and review. Winter 1995 9(2)
 Garcia, BE et al (1990) Allergol Immunopathol (Madr)18(4):187-90
 Nanda, R et al (1988) Gut 30(8):751-755
 Kemeny, DM et al (1986), Clinical Allergy 16(6): 571-581

Rozmístění antigenů na stripu - 5 Food IgG

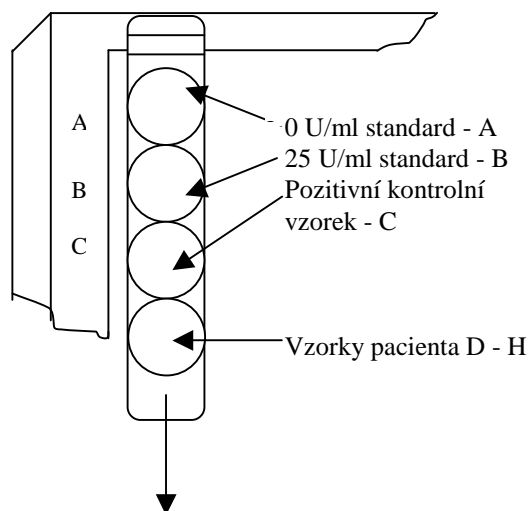
Mikrotitrační destička obsahuje 12 stripů po 8 jamkách. Pro každého pacienta se používá jeden strip.

Strip

A1	IgG standard 0,0 U/ml
B1	IgG standard 25,0 U/ml
C1	IgG pozitivní kontrolní vzorek
D1	kravské mléko
E1	pšenice
F1	směs ořechů (mandle, lískový ořech, arašidy, kešu)
G1	směs bílých ryb (treska, haddock, platýz)
H1	sójové proteiny

Důležitá poznámka:

Dříve než začnete dávkovat vzorky ujistěte se, že zkosené konce stripů musí být na horní straně rámečku.



Výrobce: Genesis Diagnostics Ltd.
 Eden Research Park, Henry Crabb Road, Littleport,
 Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom
 Tel 01353 862220 Fax 01353 863330

Distributor: LABOSERV s. r. o.
 Hudcova 532 /78b, 612 00 Brno
 Tel: 541 243 113, Fax: 541 243 114
 e-mail laboserv@laboserv.cz
<http://www.laboserv.cz>

