



Casein IgA ELISA kit (GD42)

Kvalitativní a semikvantitativní test na přítomnost protilátek IgA proti kaseinu

Casein IgG ELISA kit (GD43)

Kvalitativní a semikvantitativní test na přítomnost protilátek IgG proti kaseinu

96 testů

Pro *in vitro* diagnostiku

061103

Použití

Souprava Casein IgA a Casein IgG ELISA kit představuje rychlou metodu detekce protilátek v krevním séru vytvořených proti kaseinu, jedné ze základních složek mléka. Komponenty této soupravy jsou určeny pro *in vitro* diagnostiku.

Úvod

Přítomnost protilátek proti kaseinu je běžný nález u pacientů, kteří trpí intolerancí vůči mléku. Lze detekovat jak protilátky třídy IgG, tak protilátky třídy IgA.

V dětství je intolerance mléčného proteinu charakterizována průjmem, zvracením, kolikou a dermatitidou. U starších dětí a u dospělých se symptomy jako jsou kopřivka, artritida a ekzémy často pojí s imunitní reakcí na mléčné proteiny. Tyto symptomy obvykle mizí, když je z pacientovy diety vyloučeno mléko a mléčné výrobky.

Princip testu

Ředěné vzorky séra jsou inkubovány s kaseinem fixovaným na povrch jamek mikrotitrační destičky. Po promytí nenavázaných protilátek a složek krevního séra se přidají králičí protilátky proti lidskému IgA příp. IgG, které jsou konjugovány s křenuvou peroxidázou. Tato vazba se vytváří během druhé inkubace. Nenavázané komponenty se opět odstraní promytím a poté se k detekci vazby specifických protilátek přidá roztok obsahující 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a substrát. Přidáním stop roztoku se enzymatická reakce zastaví a vznikne pH pro vývoj zbarvení, které je následně měřeno pomocí readeru při 450 nm. Optická densita je přímo úměrná k aktivitě protilátek ve vzorku.

Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička** [12X8] odlamovacích proužků s jamkami, předem pokrytých β -lactoglobulinem, spolu s držákem ve hliníkové folii s desikantem.
- **Reagens 1:** Roztok pro ředění vzorků, 150mM trispufr, pH 7,2 s antimikrobní složkou, 15násobný koncentrát, obsah 15 ml, barva modrá, před použitím rozřeďte.
- **Reagens 2:** Promývací pufr, 15násobný koncentrát, 150mM trispufr s detergentem, pH 7,2, obsah 75 ml, před použitím rozřeďte.
- **Reagens 3:** Konjugát, králičí protilátky proti lidskému IgA (žlutý) nebo IgG (červený) konjugované s křenuvou peroxidázou v roztoku stabilizujícím proteiny a s antimikrobní složkou, obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 4:** TMB substrát, vodný roztok TMB a H₂O₂, obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 5:** Stop-roztok, 0,25M kyselina sírová, obsah 12 ml, připraveno k okamžitému použití.
- **Standard 10 U/ml (IgA nebo IgG):** 1 ml, 10mM trispufr obsahující lidské sérové IgA/IgG protilátky proti kaseinu, připraven k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek:** 1 ml, 10mM trispufr obsahující lidské sérové IgA/IgG protilátky proti kaseinu, připraven k okamžitému použití.

- **Negativní kontrolní vzorek:** 1 ml, 10mM trispufr obsahující normální lidské sérum, připraven k okamžitému použití.
- **Návod k použití soupravy**

Další potřebné zařízení

zkumavky pro ředění, odměrný válec pro přípravu promývacího pufru, přesné pipety a dostatek jednorázových špiček pro objemy 10 μ l, 100 μ l a 1ml, zařízení na promývání mikrotitračních destiček nebo vícekanálová pipeta nebo promývačka s filtrem 450 nm a případně i s referenčním filtrem 620nm, lze použít i vhodný automatický systém. Zařízení, ať už ruční nebo automatizované by mělo vyhovovat následujícím kritériím: pipety s lepší než 3% nepřesností bez vzájemné kontaminace mezi pipetováním; promývačka by měla být schopná odstranit 99% tekutiny; automat by měl být schopen minimalizovat čas mezi promýváním a přidáním další reagentie.

Upozornění

Bezpečnostní opatření

1. Všechny reagentie této soupravy jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test by měl provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat protokol testu.
3. Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí tohoto výrobku byl otestován na obsah protilátek proti HIV, HbsAg a HCV, a byl shledán negativní. Žádná testovací metoda však nemůže poskytnout úplnou jistotu, že v materiálu není přítomen infekční agens. Proto by se mělo s veškerými reagenty obsahujícími materiál lidského původu zacházet jako s materiály potenciálně infekčními. Pracovníci by měli mít při práci se sérem pacienta, nebo s produkty ze séra vyrobenými, rukavice a ochranný oděv.
4. Reagenty této sady obsahují antimikrobiální látky a roztok substrátu obsahuje 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou. Zabraňte kontaktu s pokožkou nebo jeho vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omyjte postižené místo velkým množstvím vody.
6. Jakákoli kapalina, která přijde do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem, musí být zlikvidována v kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být provedena v souladu s místní legislativou.

Technické poznámky

1. Proužky (stripy) a roztoky by se neměly používat pokud jsou sáčky, ve kterých byly uloženy, porušené, anebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky

mikrotitrační destičky dobře uzavřeny, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.

3. Při každém testu použijte i pozitivní a negativní kontrolní vzorky, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
4. Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
5. Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
6. Při dávkování konjugátu nebo TMB substrátu pipetou by mělo být nabráno takové množství reagentu, aby nebylo nutno špičku pipety opakovaně nořit do ampule s reagentem. Nepoužitý reagens nikdy nevracíte zpět do původních nádob.
7. Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
8. Přesně dodržujte popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejímu vystavení zdroji tepla.
10. Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráníte tím křížové kontaminaci.
11. Je důležité dávkovat do jamek všechny vzorky pacienta i všechny kontrolní vzorky bez prodlevy. Proto se před započítáním práce ujistěte, že všechny reagenty jsou připraveny k okamžitému použití.

Trvanlivost a skladovací podmínky

Po převzetí soupravy skladujte při teplotě 2 – 8 °C. Po otevření jsou látky soupravy stabilní po dobu tří měsíců (nebo do konce expirační doby, pokud je tato kratší než tři měsíce). Nepoužívejte soupravy s prošlou lhůtou expirace. Žádnou část soupravy nezmrazujte. Zředěný promývací roztok a ředící roztok vzorků uložený v uzavřené láhvi při teplotě 2 - 8 °C má trvanlivost 3 měsíce.

Odběr a skladování vzorků

Pro dlouhodobé skladování by vzorky séra měly být uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře rozmíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nepříznivý vliv na výsledky může mít i přidání konzervačních látek. Neměly by se používat vzorky mikrobiálně kontaminované, tepelně ošetřené nebo vzorky obsahující pevné částice. Vyhněte se používání silně hemolyzovaných, ikterických nebo lipemických vzorků.

Příprava reagensů

1. Rozředte roztok pro ředění vzorků (**Reagens 1**) 1:14 destilovanou vodou. Připravte si dostatečné množství roztoku pro provedení testu.
2. Rozředte promývací roztok (**Reagens 2**) v poměru 1:14 destilovanou vodou. Připravte si dostatečné množství roztoku pro provedení testu.

Pracovní postup

1. Naředte vzorky séra 1:100 pomocí ředícího roztoku vzorků (např. 10μl vzorku a 1ml ředícího roztoku).
2. Vyberte počet stripů potřebný pro test.
3. Pro kvalitativní rozbor dávkujte 100μl 10U/ml standardu, pozitivní a negativní kontroly a každého naředěného vzorku do příslušných jamek.
Pro semi-kvantitativní rozbor, dávkujte také 100μl zředěného ředícího roztoku vzorků jako nulový standard (0 U/ml).
4. Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
5. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivě promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším

krokem osušte jamky savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**

Postup pro ruční promývání:

Jamky vyprázdněte tak, že destičku obrátíte. Pomocí vícekanálové pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím puftrem. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

6. Do každé jamky dávkujte 100 μl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
7. Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím puftrem. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
8. Pomocí dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 μl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **10 minut**.
9. Do každé jamky přidejte 100 μl Stop-roztoku (**Reagens 5**). Aby byly dodrženy stejné doby reakce, měl by být stop-roztok dávkován do jamek ve stejném sledu jako do nich byl dávkován TMB substrát.
10. Do limitu 10 minut odečtete optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční vlnovou délku lze použít i 620 nm.

Zabezpečení kvality

Data pro zabezpečení kvality jsou uvedena na certifikátu šarže, který je přiložen k sadě. Účelem pozitivního kontrolního vzorku je sledování, zda nedošlo k vážnému selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrofotometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, by se měla z rubu vyčistit, a měla by být znovu změřena. Pokud by byly zjištěny hodnoty nižší než nula, měly by být zkontrolovány použité vlnové délky, reader by měl být znovu nastaven na základní hodnoty a měření by se mělo zopakovat

Interpretace výsledků

Kvalitativní

Porovnejte hodnoty OD vzorků od pacienta s hodnotami standardu 10 U/ml. Vzorky s hodnotou nižší než je hodnota standardu 10 U/ml jsou negativní. Vzorky s hodnotou vyšší než je hodnota standardu 10 U/ml jsou pozitivní.

Semi-kvantitativní index

$$\text{kasein-IgA/IgG index} = \frac{\text{OD vzorku} - \text{OD 0U/ml standardu}}{\text{OD standardu 10 U/ml} - \text{0U/ml standard}}$$

Index kasein-IgA/IgG vyšší než 1,00 indikuje pozitivní vzorek.

Omezení testu

Výsledky soupravy **Casein IgA/IgG** se mají posuzovat společně s výsledky jiných testů a především s klinickými projevy pacienta.

Přesnost

Koeficient odchylky v rámci jednoho testu je menší než 5%

Koeficient odchylky v mezi různými testy je menší než 12%

Shrnutí metody

- Zředte sérum ředícím roztokem (**Reagens 1**) v poměru 1:100.
- Pro kvalitativní postup napipetujte po 100μl 10U/ml standardu, kontrol a naředěných vzorků do jamek mikrotitrační destičky. Pro semikvantitativní postup

napijetujte také 100 µl ředícího roztoku vzorků jako 0U/ml standard.

- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Třikrát promyjte jamky.
- Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Čtyřikrát promyjte jamky.
- Do každé jamky dávkujte 100 µl TMB Substrátu (**Reagens 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10 minut**.
- Do každé jamky dávkujte 100 µl stop-roztoku (**Reagens 5**).
- Do 10 minut změřte optickou hustotu s použitím filtru 450 nm.

Doporučená literatura

- James, M. (1999) Towards an understanding of allergy and *in-vitro* testing. *Nat Med J 2* (4): 7-15
- Wood, R.K. *et al* (1998) Reported food intolerance and respiratory symptoms in young adults. *Eur Respir J 11*:151-155
- Barnes, R.M.R. (1995) IgG and IgA antibodies to dietary antigens in food allergy and intolerance. *Clin Exp Allergy 25* S1:7-9
- MacDonald, T.T. (1995) Evidence for cell-mediated hypersensitivity as an important pathogenic mechanism in food intolerance. *Clin Exp Allergy 25* S1:10-13
- Edwards, A.M. (1995) Food-allergic disease. *Clin Exp Allergy 25* S1:16-19
- Carter, C *et al* (1995) Dietary treatment of food allergy and intolerance. *Clin Exp Allergy 25* S1:34-42
- Ferguson, A. (1992) Definitions of food intolerance and food allergy: Consensus and controversy. *J Pediatr 121*:S7-S11
- Welsh, C.J. *et al* (1986) Comparison of the arthritogenic properties of dietary cow's milk, egg albumin and soya milk in experimental animals. *Int Arch Allergy Appl Immunol 80*(2):192-
- Nanda, R. *et al* (1988) Food intolerance and irritable bowel syndrome. *Gut 30*(8):1099-104
- McDonald, P.J. *et al* (1984) Food protein-induced enterocolitis: Altered antibody response to ingested antigen. *Pediatr Res 18* (8):751-755
- Dannaeus, A. *et al* (1977) Estimation of IgG, IgA and IgE antibodies to food antigens in children with food allergy and atopic dermatitis. *Acta Paediatr Scand 66*:31-37
- Iacono, G. *et al* (1998) Persistent cow's milk protein intolerance in infants: the changing faces of the same disease. *Clin Exp Allergy 28*:817-823
- Levy, F.S. *et al* (1996) Delayed-type hypersensitivity to cow's milk protein in Melkersson-Rosenthal syndrome: coincidence or pathogenic role? *Dermatology 192*(2):99-102
- Shakib, F. (1991) Clinical Relevance of food-specific IgG4 antibodies. *N Engl Reg Allergy Proc 9*(1):63-6
- Campbell, D.E. *et al* (1987) Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of human immunoglobulins E and G to purified cow's milk proteins: applications in diagnosis of cow's milk allergy. *J Clin Microbiol 25*(11):2114-9
- Hankard, G.F. *et al* Increased TIA1-expressing intrathelial lymphocytes in cow's milk protein intolerance *J Pediatr Gastroenterol Nutr 25*(1):79-83
- Shakib, F. *et al* (1986) Study of IgG sub-class antibodies in patients with milk intolerance. *Clin Allergy 16*(5):451-8
- Lucarelli, S. *et al* (1995) Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med 37*(3):137-41
- Shakib, F. (1991) Clinical Relevance of food-specific IgG4 antibodies. *N Engl Reg Allergy Proc 9*(1):63-6



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 78b, 612 00 Brno
Tel. 05/41243113, Fax 05/ 41243114
e-mail laboserv@laboserv.cz