



Souprava Soya IgA ELISA (GD 44)

Kvalitativní a semikvantitativní test na přítomnost protilátek IgA proti sóji

Souprava Soya IgG ELISA (GD 45)

Kvalitativní a semikvantitativní test na přítomnost protilátek IgG proti sóji

96 testů

Pro *in vitro* diagnostiku

141103

Použití

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

Úvod

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

Existují důkazy potravinové alergie na některé formy sójového proteinu, který se nachází v potravinové náhražce mléka vyráběné ze sóji. Přecitlivělost na sóju se nejčastěji vyvine v dětství jako důsledek expozice výrobkům se sóji, ale může se také vyvinout v pozdějších obdobích života. Symptomy jsou shodné se symptomy opožděné alergie. Symptomy mizí, je-li ze stravy vyloučena sója a potraviny z ní vyráběné.

Princip testu

Ředěné vzorky séra jsou inkubovány se sójou fixovanou 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 křenovou 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 sójou, 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 rozředte.
- **Reagens 2:** Promývací pufr, 15násobný koncentrát, 150mM trispufr s detergentem, pH 7,2, obsah 75 ml, před použitím rozředte.
- **Reagens 3:** Konjugát, králičí protilátky proti lidskému IgA (žlutý) nebo IgG (červený) konjugované s křenovou 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.
- **Standardy 0U/ml a 10 U/ml (IgA nebo IgG):** 1 ml, 10mM trispufr obsahující lidské sérové IgA/IgG protilátky proti sóje, připraven k okamžitému použití

- **Pozitivní kontrolní vzorek:** 1 ml, 10mM trispufr obsahující lidské sérové IgA/IgG protilátky proti sóje, 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 μl, 100μl a 1ml, zařízení na promývání mikrotitračních destiček nebo vícekanálová pipeta nebo promývací láhev, savý papír, čtečka (reader) mikrotitračních destiček 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.

- Před použitím nechejte všechny reagenty a mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité proužky mikrotitrační destičky dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.
- Při každém testu použijte i pozitivní a negativní kontrolní vzorky, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentů a správné provedení testu.
- Přesně dodržujte uvedené doby a teploty inkubace.
- Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela odděleně od reagentu substrátu.
- 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 nevráťte zpět do původních nádob.
- Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
- Přesně dodržujte popsany promývací postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
- Během všech inkubačních kroků zabraňte osvětlení destičky přímým slunečním světlem nebo jejím vystavení zdroji tepla.
- Barevné uzávěry nasadte zpět na správné ampule. Zabráníte tím křížové kontaminaci.
- 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 soupravu 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

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

Pracovní postup

- Naředte vzorky séra 1:100 pomocí ředícího roztoku vzorků (např. 10μl vzorku a 1ml ředícího roztoku).
- Vyberte počet stripů potřebný pro test.
- 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 nulový standard 0U/ml .
- Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek a třikrát je promyjte v automatické promývačce mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivé

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 vícekanalové pipety nebo promývací láhve jamky naplňte promývacím puřem. Opět jamky vyprázdněte obrácením destičky, a osušte je savým papírem. Tento proces opakujte ještě dvakrát.

- Do každé jamky dávkujte 100 μl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- Po 30 minutách inkubace odsajte obsah jamek, a pečlivě je čtyřikrát promyjte promývacím puřem. Oklepejte destičku na savý papír, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
- Pomocí dávkovací pipety rychle do každé jamky dávkujte 100 μl TMB Substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **10 minut**.
- 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.
- Do limitu 10 minut odečtěte 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 zbarvení, 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 pro IgA proti sóje. Vzorky s hodnotou vyšší než je hodnota standardu 10 U/ml jsou pozitivní pro IgA proti sóje.

Semi-kvantitativní index

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

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

Omezení testu

Výsledky soupravy Soya IgA/IgG ELISA se musí posuzovat společně s výsledky jiných testů a především s klinickými projevy pacienta.

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 napipetujte také 100 μl 0 U/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):192-9
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
Haeney M.R. *et al* (1982) Soya protein antibodies in man: their occurrence and possible relevance to coeliac disease. *J Clin Pathol* 35(3):319-22
Dreau, D. *et al* (1995) IgM, IgA, IgG1 and IgG2 specific responses in blood and gut secretions of calves fed soyabean products. *Vet Immunol Immunopathol* 47(1-2):57-67
Kovacs, T. *et al* (1996) Relationship between intestinal permeability and antibodies against food antigens in IgA nephropathy 137(2):65-9



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. 541 243 113, Fax 541 243 114
e-mail laboserv@laboserv.cz