

ELISA celkový imunoglobulin E

Kvantitativní test na stanovení celkového množství IgE

Kód výrobku GD09

96 testů

Reagenty této soupravy jsou určeny pouze pro *in vitro* diagnostiku.

20020722

1. Použití

ELISA souprava je určena k citlivému stanovení celkového množství IgE v lidském krevní séru. Je určena pro diagnostiku atopie u dětí i dospělých. Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro diagnostiku *in vitro*.

2. Úvod.

Imunoglobulin E má molekulární strukturu podobnou struktuře imunoglobulinů ostatních tříd s dvěma specifickými vazebnými receptory antigenů připojenými ke konstantní části Fc-fragmentu. IgE v séru nemá žádné známé biologické vazby a jeho efekt se projevuje jen pokud je navázán na basofily a mastocyty. Mediátory uvolněné z těchto buněk odpovídají za časnou hypersenzitivní reakci.

Mechanismy regulující syntézu IgE se liší od těch, které syntetizují imunoglobuliny ostatních tříd. U normálních jedinců jsou jejich hladiny v séru nízké. Tyto hladiny během dětství stoupají, až mezi 15 a 20 rokem dosáhnou úrovně dospělého. Protože hladiny IgE jsou obvykle nízké, specifická odpověď IgE na alergen často způsobí signifikantní vzestup hladiny IgE v organismu.

Tato souprava je kalibrována podle "Second International IgE Reference Serum: 75/502 (IU/ml)". Zvýšená celková hladina IgE ukazuje na atopickou predispozici, ale neposkytuje žádnou indikaci agentu, který ji vyvolal. Zvýšené hladiny IgE se vyskytují u pacientů s parazitickým onemocněním, tropickou eosinofilií a během reakcí na určité drogy.

Měření celkové hladiny IgE je neefektivnější u diagnostiky atopie u malých dětí. U dospělých se mezi jedinci s atopií a zdravou populací objevuje přesah. U zdravé populace se objevují hodnoty do 120 IU/ml. Většina pacientů s atopickým onemocněním má hladinu nad 120 IU/ml. Mezi pohlavími není žádný rozdíl normálních koncentrací IgE.

3. Princip testu

Předředěné vzorky krevního séra jsou inkubovány s monoklonálními anti-lidskými IgE imobilizovanými na stěnách jamek mikrotitrační destičky. Po vymytí nenavázaných komponentů séra, se do jamek přidá konjugát monoklonální myší anti lidské IgE a peroxidázy, který se během druhé inkubace naváže na již navázaný IgE. Přebytek konjugátu se odstraní promytím a do jamek se přidá roztok TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) s enzymatickým substrátem. Po inkubaci se přidáním stop-roztoku reakce zastaví za vzniku příslušného zabarvení. Optické hustoty standardů, kontrolních vzorků a testovaných vzorků se měří na ELISA readeru při 450 nm. Optická hustota zabarvení je přímo úměrná koncentraci IgE ve vzorku.

4. Materiály dodávané v sadě

- **Mikrotitrační destička:** 12 lomitelných stripů po 8 jamkách, potažených monoklonálními anti-IgE, s rámečkem, zabalených v plastovém sáčku s vysoušedlem.
- **Reagens 1: Ředící roztok vzorků:** 10mM; proteinový pufr; pH 7,2; s antimikrobiální látkou; obsah 50 ml, (barva modrá), připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 2: Promývací pufr:** 150mM; Tris pufr s detergentem; pH 7,2; obsah 75 ml; 15x koncentrovaný.
- **Reagens 3: Konjugát:** konjugát myší anti-lidský IgE s křenovou peroxidázou ve stabilizujícím roztoku s antimikrobiální látkou; obsah 12 ml, (barva červená), připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 4: TMB Substrát** vodný roztok TMB a peroxidu vodíku; obsah 12 ml; připraven k okamžitému použití.
- **Reagens 5: Stop-roztok** 0,25M kyselina sírová; obsah 12 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Standardy:** 10mM; lidské sérum s obsahem IgE, 0, 50, 150, 375, 1250, 1 ml; připraveny k okamžitému použití.
- **Positivní kontrolní vzorek:** lidské sérum IgE; 1 ml; připraven k okamžitému použití.
- **Návod k použití**

5. Další potřeby nutné k provedení testu

- zkumavky na roztoky
- kalibrováný odměrný válec pro přípravu promývacího roztoku
- automatické pipety a jednorázové špičky pro dávkování 20 µl, 100 µl a 1 ml

- promývačka mikrotitračních destiček nebo vícekanálová pipeta
- deionizovaná voda
- savý papír
- ELISA reader s filtrem o OD 450 nm, případně s referenčním filtrem 620 nm

6. Upozornění

6.1 Bezpečnost

1. Všechny reagenty této soupravy jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test smí provádět pouze zkušený laboratorní personál. Je nutné striktně dodržovat pracovní protokol testu.
3. Veškerý materiál lidského původu použitý pro přípravu standardů a kontrolních vzorků, které jsou součástí této soupravy 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 musí 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 TMB. Zabraňte jejich kontaktu s pokožkou a očima. Pokud ke kontaktu dojde, omývejte postižené místo velkým množstvím vody.
5. Stop-roztok obsahuje 0,25 M kyselinu sírovou. Zabraňte jeho kontaktu s pokožkou nebo vniknutí do očí. Pokud ke kontaktu dojde, omývejte 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.

6.2 Technické poznámky

1. Stripy a roztoky se nesmějí používat pokud jsou jejich obaly porušené anebo pokud prosakují.
2. Před použitím nechte všechny reagenty i mikrotitrační destičku zahřát na pokojovou teplotu. Zabezpečte, aby byl plastový sáček obsahující nepoužité stripy dobře uzavřen, a aby v něm bylo vloženo vysoušedlo. Skladujte je při teplotě 2 – 8 °C.
3. Při každém testu použijte i pozitivní kontrolní vzorek, 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 nevráťte zpět do původních nádob.
7. Mezi inkubačními kroky nenechávejte mikrotitrační jamky vyschnout.
8. Přesně dodržujte popsáný promývací postup. Nedostatečné promytí může silně ovlivnit získané výsledky.
9. Během 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.

7. Trvanlivost a skladovací podmínky

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

8. Odběr a skladování vzorků

Při dlouhodobém používání a skladování by vzorky séra měly být uloženy při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se vzorky musí před testem dobře promíchat. 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 nebo lipemických vzorků.

9. Příprava reagentů

Rozředte pufr (**Reagens 2**) destilovanou vodou v poměru 1 : 14, abyste získali dostatečné množství pufru pro provedení celého testu.

10. Postup testu

Vyberte počet proužků potřebný pro test.

1. Dávkujte 100 µl standardů a pozitivního kontrolního vzorku. Dávkujte 20 µl vzorku pro určeného k testování a 80 µl ředícího roztoku vzorku do každé jamky se vzorkem (vznikne roztok 1:5). Destičku protřepejte, aby se obsah jamek promíchal.

2. Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **60 minut**. Během inkubace zabraňte přímému osvětlení slunečním světlem nebo vystavení přímému zdroji tepla.

3. Po inkubaci destičku třikrát je promyjte v automatické promývače mikrotitračních destiček nebo ručním promytím (viz níže). Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem osušte povrch jamek savým papírem. **Nenechávejte jamky vyschnout.**

Postup pro ruční promývání:

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

4. Do každé jamky dávkujte 100 µl konjugátu (**Reagens 3**). Inkubujte destičku při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.

5. Po inkubaci destičku pečlivě čtyřikrát promyjte promývacím pufrům. Osušte povrch destičky savým papírem, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.

6. Pomocí multikanálové pipety do všech jamek dávkujte 100 µl TMB substrátu (**Reagens 4**). Inkubujte destičku po dobu **10 minut**.

7. 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.

8. Do 10 minut odečtete optickou hustotu (OD) každé jamky readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční filtr lze použít 620 nm.

Kontrola kvality

Data kontroly kvality soupravy pro příslušnou výrobní šarži, jsou uvedena na certifikátu, který je přiložen k soupravě.

Účelem zařazení pozitivní kontroly do stanovení 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.

12. Interpretace výsledků

Pomocí souřadného systému vyneste do grafu hodnoty optické hustoty každého ze standardů ve vztahu k jejich koncentraci. Z této křivky zjistíte hodnoty neznámých vzorků. U vzorků majících naměřené hodnoty vyšší než 1250 IU/ml, by měl být test zopakován při použití vyššího ředění vzorků.

Referenční rozsah

Následující rozpětí IgE jsou uvedena pouze jako základní vodítka. Laboratoř by si měla určit svůj vlastní referenční rozsah, protože výsledky mohou být ovlivněny geografickými faktory.

Věk	(IU 75/502)
Novorozenec	> 6
Do 3 měsíců	>14
Do 1 roku	>37
Do 5 let	>67
Do 10 let	>81
Starší 15 let	>107

U pacientů s hodnotami IgE pod výše uvedenými úrovněmi je pravděpodobnost atopického onemocnění nízká. Výsledky je nutno posuzovat v souladu s dalšími klinickými informacemi o pacientovi.

13. Limitace procedury

- Výsledky toho testu by se měly interpretovat v souladu s klinickým nálezem a se záznamy pacienta.
- Imunitní odpověď IgE je krátkodobá. Pacienti, kteří v poslední době nebyli vystaveni atopické expozici mohou vykazovat nízké hladiny IgE.
- Výsledky tohoto testu nejsou diagnostickým důkazem přítomnosti nebo absence atopického onemocnění.

14. Charakteristiky**Inter-assay CV**

	IgE IU/ml	CV%
Vzorek A	497	3.0
Vzorek B	614	3.1
Vzorek C	2013	4.7

Intra-assay CV

typicky <12%

Linearity

Sérová ředění séra vykazují lineární odpověď.

Ředění	změřený IgE	Opravený IgE
neředěný	784	784
1:1	387	774
1:2	191	764
1:4	98	784

Shrnutí postupu

- Dávkujte **standards, pozitivní kontrolu** po **100 µl**.
- Dávkujte **20 µl** každého testovaného **vzorku**.
- Dávkujte **80 µl ředícího roztoku** do jamek se vzorkem (Reagens 1).
- Inkubace při pokojové teplotě **60 minut**.
- Promytí **3x**.
- Do každé jamky dávkujte **100 µl konjugátu** (Reagens 3).
- Inkubace při pokojové teplotě **30 minut**.
- Promytí **4x**.
- Do každé jamky přidejte **100 µl TMB substrátu** (Reagens 4).
- Inkubace při pokojové teplotě **10 minut**.
- Do každé jamky přidejte **100 µl stop-roztoku** (Reagens 5).
- Měření **filtr 450 nm** nebo 450 / 620 nm (dvojí vlnová délka).

Literatura

Pollart SM, Smith TF, Morris EC, et al. Environmental exposure to cockroach allergens: analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:50510.

Chapman MD. Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. *Allergy* 1988;43:714.

Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, et al. Increased sensitivity and specificity of a sandwich **ELISA** for measurement of **IgE** antibodies. *J Immunol Methods* 1985;78:21726.

Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, et al. The use of monoclonal and polyspecific antibodies in the **IgE** Sandwich **ELISA**. *J Immunol Methods* 1986;87:4550.

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, Česká republika

Tel: 541 243 113, Fax: 541 243 114

e-mail laboserv@laboserv.cz

