

40 Foods IgG Screen ELISA Kit

souprava na stanovení IgG protilátek

proti 40 druhům potravin

Kat. číslo GD15

Souprava je určena pouze pro in-vitro diagnostiku

050202

Použití

Souprava je určena pro rychlé stanovení hladiny protilátek IgG v lidském krevním séru nebo plazmě proti antigenům potravy při diagnostice nesnášenlivosti pacienty na různé druhy potravin. Výsledky testu se vždy musí uvést do souvislosti s výsledky klinického vyšetření pacienta, protože ani zvýšená hladina protilátek IgG proti potravinovým alergenům se nemusí projevit jako symptom. Výsledky tohoto testu nepodávají žádné informace o případné alergii vyvolané IgE. Komponenty této soupravy jsou určeny pouze pro použití k výzkumu.

Úvod

Mnoho pacientů vykazuje chronické reakce na určité potravinové antigeny. Na rozdíl od okamžitého efektu alergie zprostředkované IgE, se příznaky reakce citlivosti na potraviny zprostředkované IgG mohou objevit až po několika dnech.

Pacientovy problémy může zmenšit odstranění těch potravin, které způsobují problémy, z jeho jídelníčku. S přecitlivělostí na potraviny mohou být spojeny následující syndromy: obecná otupělost, nadváha, dermatitida, artritida, chronická únava a střevní potíže.

Princip testu

Souprava využívá mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Na jejich povrchu jsou nanášeny extrakty ze 40 různých potravin, některé jednotlivě, jiné ve směsi. Do jednotlivých jamek je přidán vzorek krevního séra (zředěný v poměru 1 : 100) a inkubuje se 30 minut. Na antigeny v jamkách se naváží protilátky specifické pro danou potravinu pokud jsou v testovaném séru přítomny.

Po promytí destičky se navázané protilátky detekují pomocí konjugátu (králičí anti-lidské IgG konjugované s peroxidázou). Po 30 minutové inkubaci se nenavázaný konjugát odstraní promytím a 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 při vlnové délce 450 nm a 620 nm.

Materiály dodávané v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** 12 stripů po 8 jamkách s předem nanesenými antigeny různých potravin; stripy jsou seskupeny po třech a označeny číslicemi 1, 2 a 3
- **Reagens 1:** Ředící roztok vzorků, 4 x 2,5 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 ml od každého; připraveny k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek:** 1 ml, připraven k okamžitému použití.
- **Návod k použití**

Další vybavení potřebné pro provedení testu

100µl pipeta; 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 nutno dodržovat standardní laboratorní bezpečnostní opatření.
- Při práci s výrobky na bázi lidského séra musí laboranti mít rukavice a ochranný pracovní oděv.
- Stop-roztok obsahuje 0,25molární kyselinu sírovou (žíravina).

Vzorky

Vzorky séra nebo plasmy se mohou dlouhodobě používat pokud jsou skladovány při teplotě -20 °C. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu.

Metodika

Před zahájením práce nechejte všechny materiály dosáhnout pokojovou teplotu.

Soupravou je určena k testování vzorků jednoho až čtyř pacientů.

Vzorky séra nebo plasmy se musí před testem zředit v poměru 1 : 100. Přidejte 25 µl séra do jedné z ampulí s roztokem pro ředění vzorků (**Reagens 1**).

Je velmi důležité dávkovat vzorky a standardy do jamek bez jakékoli prodlevy. Pomalé dávkování nebo přestávky při dávkování mohou způsobit zkreslení výsledků testu. Pro dávkování předředěného vzorku doporučujeme použít multikanálovou pipetu.

Stripy s jamkami

Mikrotitrační destička se skládá z jednotlivých stripů označených čísly 1, 2, 3. Stripy je nutno používat ve správném pořadí tzn. zleva doprava 1 - 2 - 3. Pro každého pacienta je určena jedna sada stripů. Seznam nanesených antigenů nebo jejich směsí najdete dále v návodu. Nepoužité stripy uložte zpět do plastového sáčku s vysoušelem a mohou být použity později.

Standardy

Dávkujte 100µl každého standardu do jamek stripu 1.

Jamka	Standard U/ml
A	0
B	25

Pozitivní kontrolní vzorek

Dávkujte 100µl pozitivní kontroly do C jamky stripu 1.

Testované vzorky

Dávkujte 100µl předředěného vzorku do zbylých jamek:

Strip 1: jamky D, E, F, G, H

Strip 2: jamky A, B, C, D, E, F, G, H

Strip 3: jamky A, B, C, D, E, F, G, H

Stripy vložené v rámečku inkubujte **30 minut** při pokojové teplotě. Během všech inkubací se vyhněte přímému 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 tříkrát promyjte 350 µl promývacího pufru. Pečlivé promytí 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 v inkubačním sáčku při pokojové teplotě **30 minut**. Pak odsajte obsah jamek a každou z nich pečlivě čtyřikrát promyjte 350 µl promývacího pufru.

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

Pomocí multikanálové pipety 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 změřte 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 vynesete do grafu ve vztahu ke koncentracím. Vynesené body spojte přímkou. Z této čáry můžete vyčíst koncentraci protilátek IgG pro každý uvedený typ potravinu.

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

- Zředte sérum v ampuli s ředícím roztokem v poměru 1:100.
- Seřaďte si stripy 1, 2 a 3 podle testovaných pacientů.
- Do správných jamek dávkujte standardy a zředěné vzorky (100µl).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.
- *Tříkrát 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 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 - 40 Food IgG

Mikrotitrační destička obsahuje 12 stripů po 8 jamkách, které jsou označeny následujícím způsobem:

- 4 stripy jsou označeny číslem 1
- 4 stripy jsou označeny číslem 2
- 4 stripy jsou označeny číslem 3

Pro každého pacienta použijte sadu stripů 1-2-3. Níže uvedená tabulka ukazuje umístění jednotlivých antigenů.

Strip 1

A1	standard IgG protilátek 0.0 U/ml
B1	standard IgG protilátek 25.0 U/ml
C1	pozitivní kontrolní vzorek protilátek
D1	kukuřice
E1	oves
F1	rýže
G1	žito
H1	pšenice

Strip 2

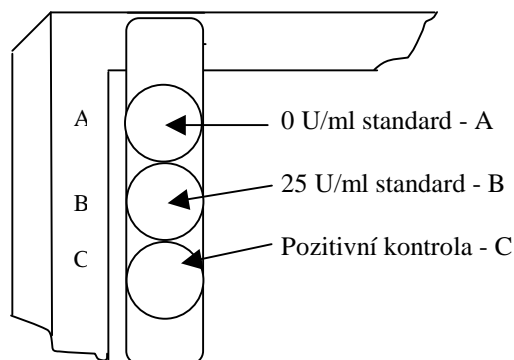
A2	kravské mléko
B2	vaječný bílek
C2	vaječný žloutek
D2	směs bílých ryb (treska obecná + treska skvrnitá + platýz)
E2	směs koryšů (krab + humr + garnát)
F2	mrkev
G2	směs luštěnin (bílé fazole + tmavé fazole + sója + hrášek)
H2	směs brukví (zelí + brokolice + květák)

Strip 3

A3	brambor
B3	jablko + hruška
C3	směs bobulovin (malina + jahoda + ostružina)
D3	směs citrusů (pomeranč + citron + grapefruit)
E3	směs suchých plodů (mandle + kešu + lískový ořech + arašíd)
F3	kvasnice (pekařské + pivovarské)
G3	kuře + krůta
H3	vepřové maso

Důležitá poznámka:

Dříve než začnete dávkovat vzorky ujistěte se, že stripy jsou v rámu sestaveny správně. Zkosené konce stripů musí být na horní straně rámu



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
<http://www.laboserv.cz>

