

Súprava ELISA-anti-MILK-II-G je určená na kvantitatívne stanovenie špecifických protilátok triedy IgG proti bielkovinám kravského mlieka v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 40 neznámych vzoriek v duplikátoch.

Kravské mlieko patrí do skupiny potencionálnych potravinových alergénov, t.j. látok proteínovej povahy, ktoré vyvolávajú u precitlivých jedincov chorobné stavy charakterizované abnormálnou imunitnou odpoveďou ľudského organizmu na tieto látky. Kravské mlieko obsahuje viac než 20 rôznych proteínov, z ktorých iba niektoré vyvolávajú imunitnú odpoveď s patofyziologickými dôsledkami (kazeín, β -laktoglobulín a α -laktalbumín). Zvýšené hladiny protilátok proti kravskému mlieku v ľudskom sére sú indikátorom alergických ochorení s kožnými symptómami (atopický ekzém, žihľavka), gastrointestinálnymi symptómami (detské koliky, hnačky, zvracanie) a respiračnými symptómami (nádcha, opakovaná sýpavosť). Alergia na kravské mlieko sa najčastejšie vyskytuje u novorodencov a detí do troch rokov.

PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariadeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigén. Po inkubácii sa premytím odstránia nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrebovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

ZLOŽENIE

1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov aktivovaných antigénom.

2. Štandardy

6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgG proti mlieku s koncentraciou 0 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 U.ml⁻¹. Štandardy sú vyriedené v zriedčovacom roztoku, pripravené na použitie.

3. Kontrolné vzorky

2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnu a pozitívnu, sú vyriedené v zriedčovacom roztoku, pripravené na použitie. Koncentrácie sú uvedené v Osvedčení o súprave.

4. Substrát TMB

1 fľaštička (8 ml) s TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

5. Zriedčovací roztok

2 fľaštičky (2 x 50 ml) s TRIS-HCl tlmivým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2% azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

6. Vymývací roztok

1 fľaštička (50 ml). Obsah fľaštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

7. Konjugát HRP-anti-IgG

1 fľaštička (12 ml) s konjugátom HRP-anti-IgG. Je pripravený na použitie.

8. Kyselina sírová

1 fľaštička (8 ml) s roztokom 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrazení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 μ l séra sa zriedi prídavkom 1 ml zriedčovacieho roztoku.

DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy, negatívna, pozitívna vzorka a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužitú stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovačom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývací roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:

- po 100 μ l štandardov
- po 100 μ l negatívnej kontrolnej vzorky
- po 100 μ l pozitívnej kontrolnej vzorky
- po 100 μ l pacientskych zriedených vzoriek

2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.

3. Po ukončení inkubácie stripy 4x premyte vymývacím roztokom, pripraveným podľa návodu.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napietovaní cca. 250 μ l vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

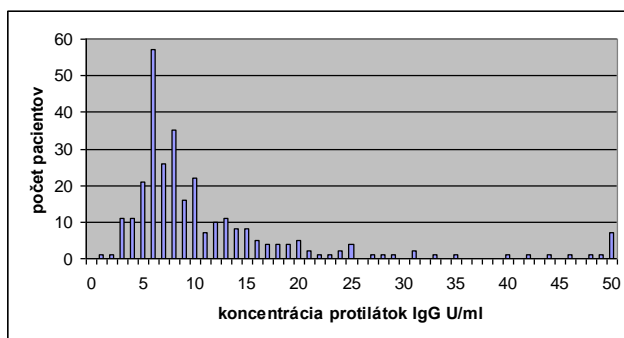
4. Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
5. Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
6. Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
7. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
8. Vyfarbuje sa 15 min v tme.
9. Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
10. Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 – 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hod po skončení vyvíjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Keď nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard, kontrolné a pacientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesím logaritmu koncentrácií štandardov ($U \cdot ml^{-1}$) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií kontrolných a pacientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne. Avšak, aj u asymptomatických, zjavne zdravých osôb môžu byť zvýšené hladiny protilátok proti mlieku.



Hodnoty boli získané na základe stanovenia sér 300 darcov krvi. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.

Odporúčame nasledovné hodnotenie výsledkov:

- Negatívne hodnoty <math>< 15 U \cdot ml^{-1}</math>
- Hraničná hodnota 15 - 20 $U \cdot ml^{-1}$
- Pozitívne hodnoty > 20 $U \cdot ml^{-1}$

KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.

- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.
- Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

Štandardizácia

Štandardy súpravy ELISA-anti-MILK-II-G sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Merací rozsah

6,25-100 $U \cdot ml^{-1}$.

Čitlivosť

Detekčný limit súpravy je 5 $U \cdot ml^{-1}$.

Špecifita

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgG proti antigénom kravského mlieka.

Opakovateľnosť

INTRA-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	17	17	17
Priemer $U \cdot ml^{-1}$	6,90	23,74	45,39
SD $U \cdot ml^{-1}$	0,15	1,68	3,01
C.V. %	2,16	7,08	6,63

Reprodukovateľnosť

INTER-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	21	21	21
Priemer $U \cdot ml^{-1}$	7,14	14,95	46,36
SD $U \cdot ml^{-1}$	0,39	0,93	3,22
C.V. %	5,46	6,22	6,95

Recovery

Metódou štandardného prídavku sa získajú hodnoty 80 -120%.

UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducich príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6803 220, biogema4@stonline.sk
- Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Kyselina sírová, v koncentrácii 0,5 mol.l⁻¹, môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentraciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciach súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancí

vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV protilátok . Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte gumené rukavice.

- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté súpravou ELISA-anti-MILK-II-G len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí expiračnej doby.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba expirácie súpravy je **9 mesiacov** odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

LITERATÚRA:

Barnes,R.M.R.: IgG and IgA antibodies to dietary antigens in food allergy and intolerance. Clin. Exsp. Allergy., 1995, 25, 7-9

Bayer,M., Kutílek,Š.: Současný pohled na problematiku intolerance bílkovin kravského mléka u dětí. Prakt. Lék., 1994,74,(10), 466-467

Bottaro,G., Failla,P., Rotolo,N., Azzaro,F., Pennisi,P., Pasqualetto, A., Castiglione,N., Patane,R.: Significance of milk antibodies to cow's milk protein intolerance. Pediatr. Med. Chir. 1992, 14, (1) 21-25

Atkinson, W., Sheidon,T.A., Shaath,N., Whowell,P.J.: Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome : a randomised controlled trial. Gut, 2004, 53(10), 1459-1464

Hrubiško,M. a kol.: Alergológia, Osveta, Martin, 2003, 165-166

Jyonouchi,H., Geng,L., Ruby,A., Zimmerman-Bier,B.: Disregulated innate responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention. Neuropsychobiology. 2005, 51, (2), 77-85

