

Súprava ELISA-anti- α -LAKTALBUMÍN-II-A je určená na stanovenie špecifických protilátok triedy IgA proti bielkovine kravského mlieka - α -laktalbumínu v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 45 neznámych vzoriek v duplikátoch.

Kravské mlieko patrí do skupiny potenciálnych 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 sú alergény (kazeín, β -laktoglobulín a α -laktalbumín). α -laktalbumín tvorí 2 – 5% bielkovín kravského mlieka. Imunologicky sa alergia na proteíny kravského mlieka klasifikuje ako alergia závislá na IgE a alergia nezávislá na IgE, ktorá sa označuje aj ako intolerancia na kravské mlieko. Tvoria sa protilátky typu IgG, IgA a IgM.

PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigen 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 antigen. Po inkubácii sa premytím odstránia nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá chromogénny substrát a enzýmová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou kontrolnej vzorky cut off. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

ZLOŽENIE

8-jamkové lámateľné stripy aktivované antigénom	12 ks
Kontrolná vzorka negatívna	1 ks
Kontrolná vzorka cut off	1 ks
Kontrolná vzorka pozitívna	1 ks
Konjugát HRP-anti-IgA	1 ks
Substrát TMB	1 ks
Zriedovací roztok	2 ks
Vymývací roztok	1 ks
Kyselina sírová	1 ks

1. Kontrolné vzorky

3 fľaštičky (3 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou, cut off (hraničnou) a pozitívnu sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Absorbancie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

2. Konjugát HRP-anti-IgA

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

3. Substrát TMB

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

4. Zriedovací 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 \pm 0,2. Je pripravený na použitie.

5. Vymývací roztok

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

6. 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 zriedovacieho 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 kontrolné vzorky a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužitú stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovacím vadmom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývací roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:

- po 100 μ l negatívnej kontrolnej vzorky do radu A
- po 100 μ l cut off vzorky do radu B
- po 100 μ l pozitívnej kontrolnej vzorky do radu C
- po 100 μ l pacientskych zriedených vzoriek do nasledujúcich radov.

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 napipetovaní 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-IgA 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

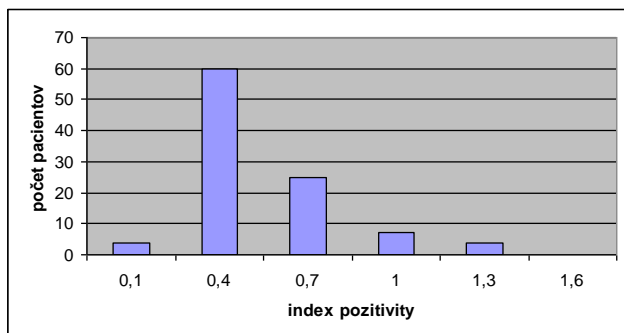
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre všetky kontrolné vzorky a pacientske séra
- Vypočítajte index pozitivity podľa vzorca:

$$IP = \frac{\bar{A}_{vzorky}}{\bar{A}_{cut\ off}}$$

IP = index pozitivity

\bar{A} = priemerná absorbancia

OČAKÁVANÉ HODNOTY



Tieto hodnoty boli získané spracovaním 100 sér darcov krvi. Hodnoty by mali byť považované len za orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek

- Odporúčame hodnotenie pomocou vypočítaných indexov pozitivity:

Index pozitivity negatívnych hodnôt < 1

Index pozitivity hraničných hodnôt 1 – 1,3

Index pozitivity pre pozitívne hodnoty > 1,3

KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia negatívnej kontrolnej vzorky by mala byť menej ako 0,5.
- Absorbancia cut off kontrolnej vzorky by mala minimálne 2x hodnotu absorbancie negatívnej kontrolnej vzorky.
- Absorbancia pozitívnej kontrolnej vzorky by mala dosahovať minimálne 1,5x hodnotu absorbancie kontrolnej vzorky cut off.
- Hodnoty kontrolných vzoriek stanovené pri výstupnej kontrole sú uvedené v Osvedčení o súprave.

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 koncentráciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciach súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Kontrolné vzorky obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancií 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-α-LAKTALBUMÍN-II-A len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok. Reagencie nepoužívajte po uplynutí expiračnej doby.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužitý zvyšky pacientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužitý 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

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba expirácie súpravy je 6 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