



Garbiarska 2, 040 01 KOŠICE



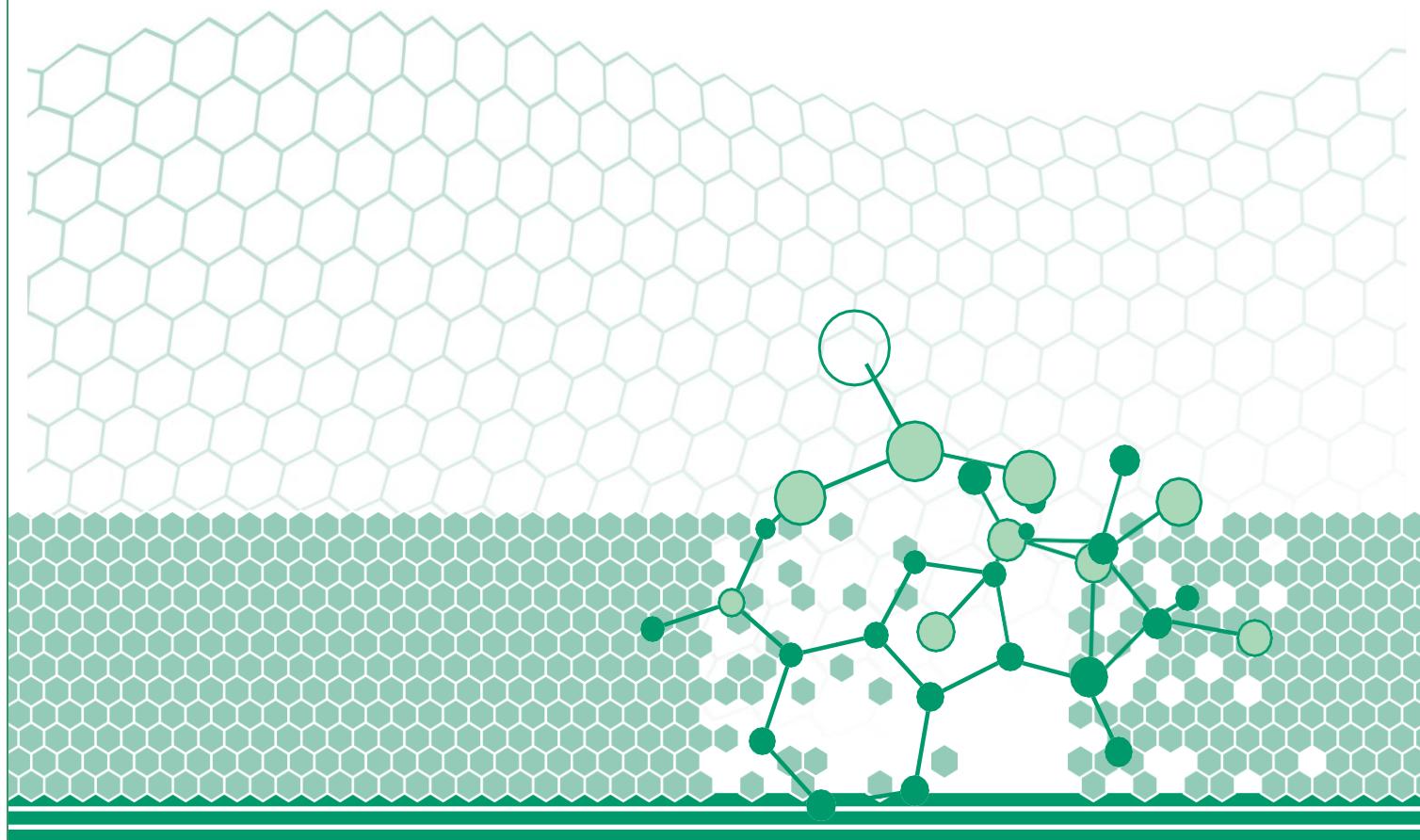
Návod na použitie

ELISA-anti-SÓJA-II-A

REF E-490



IVD



Súprava ELISA-anti-SÓJA-II-A je určená na stanovenie špecifických protilátok triedy IgA v ľudskom sére proti proteínom zo sójových bôbov. Umožňuje v duplikátoch stanoviť špecifické protilátky v 45 vzorkách neznámych sér.

Stravné návyky nášho obyvateľstva sa menia smerom k používaniu väčšieho množstva rastlinnej potravy. Vo veľkej miere sa konzumujú produkty zo sójových bôbov ako náhrada za mäso. Tým sa do ľudského organizmu dostáva nový typ rastlinných proteínov – zásobné proteíny bôbov, a tiež funkčné proteíny – enzymy a inhibítory trypsínu a chymotrypsínu. Zvláštnu skupinu tvoria v sójových bôboch bohatá zastúpené glykoproteíny, nazývané tiež lektíny. Alergickí pacienti vytvárajú individuálne špecifické protilátky proti rôznym proteínom zo sóje. Bolo dokázané, že zo zložitého proteínového komplexu sójových bôbov až 16 proteínových frakcií viaže IgE špecifické protilátky zo sér pacientov alergických na sóju. U detí s intoleranciou na kravské mlieko sa často mlieko nahradza sójovými preparáti, ktoré u citlivých jedincov môžu vyvoláť alergické reakcie, ako sú žihľavka, astma, gastrointestinálne potiaže, prípadne môžu vyvoláť anafylaktickú reakciu. Ak sú citliví jedinci vystavení účinku sójového prachu a múky, tieto môžu byť príčinou alergickej astmy, nádchy a iných prejavov respiračnej alergie bez toho, aby jedinci prejavovali známky alergie na sóju.

PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariedeneho 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 chrenovej 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

Nezamieňať substancie z iných súprav!

1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov potiahnutých antigénom.

2. Kontrolné vzorky

3 fláštičky - 1 fláštička (1 ml) s kontrolou vzorkou negatívou, 1 fláštička (1 ml) s kontrolou vzorkou cut off (hraničou) a 1 fláštička (1 ml) s kontrolou vzorkou pozitívou, sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Absorbancie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

3. Konjugát HRP-anti-IgA

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

4. Substrát TMB

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

5. Zriedovací roztok

1 fláštička (100 ml) s TRIS-HCl tlmiacim 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 fláštička (50 ml). Obsah fláštičky s vymývacím roztokom dopríť do 1000 ml destilovanou vodou.

7. Kyselina sírová

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

PRÍPRAVA VZRIEK

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 rozmrzení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 1:101, t.j. 10 µl séra sa zriedi príďavkom 1 ml zriedovacieho roztoku.

DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagencie musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporučame, aby sa kontrolné vzorky a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužité stripы uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývací roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:

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

2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.

- 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 µl vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

- Po ukončení premývania mikrotitračného doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
- Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgA a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
- Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
- Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
- Vyfarbuje sa 15 min v tme.
- Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
- 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 ukončite najneskôr do 1 hod po skončení vyvýjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

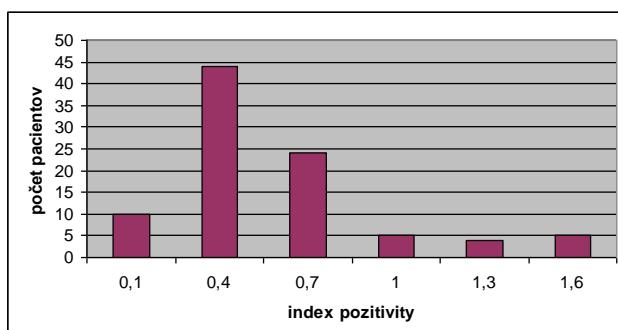
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre všetky kontrolné vzorky a pacientske séra
- Vypočítajte index pozitivity podľa vzorca:

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

IP = index pozitivity

\bar{A} = priemerná absorbancia

OČAKÁVANÉ HODNOTY



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

- Odporučame 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 stanovené pri výstupnej kontrole súpravy sú uvedené v Osvedčení o súprave.

Opakovateľnosť

INTRA-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	16	16	16
IP priemer	0,374	0,956	1,979
IP SD	0,034	0,049	0,146
C.V. %	9,10	5,13	7,38

Reproduktovatelnosť

INTER-ASSAY	A	B	C
Počet stanovení	14	14	14
IP priemer	0,651	1,290	2,112
IP SD	0,099	0,165	0,152
C.V. %	15,21	12,79	7,20

Recovery

Metódou štandardného prídatku 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 6228 131, biogema4@biogema.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 koncentráции 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. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté súpravou ELISA-anti-SÓJA-II-A len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky pacientskych 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 exspirácie súpravy je 9 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

LITERATÚRA:

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

Ogawa,T., Bando,N., Tsuji,H., Okajima,H., Nishikawa,K., Sasaoka,K.: Investigation of the IgE-bindingproteins in soyabeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1991, 37, 555-565

González,R., Zapatero,L., Caravaca,F., Carreira,J.: Identification of soybean proteins responsible for respiratory allergies. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1991, 95, 53-57

Herian,A.M., Taylor,S.L., Bush,R.K.: Identification of soybean allergens by immunoblotting with sera from soy-allergic adults. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 1990, 92, 193-198

Bernhisel-Broadbent,J., Taylor,S., Sampson,H.A.:Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. II. Laboratory corellates. J. Allergy Clin. Immunol., 1989, 84, 701-709

Voller,A., Bartlett,A., Bidwell,D.E.: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J. Clin. Pathol., 1978, 31, 507-520

Catsmpoolas,N., Meyer,E.W.: Immunochemical study of soybean proteins. J. Agr. Food Chem., 1968, 16, 128-131

EN ISO 9001 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality		Pozri návod na používanie		Podniková norma
EN ISO 13485 v platnom znení	Certifikovaný systém manažérstva kvality pre zdravotnícke pomôcky		Nepoužívať opakovane		Použiteľné do
	Značka zhody so Smernicou Európskeho parlamentu a Rady 98/79/ES a NV SR č. 569/2001 Z.z.		Diagnostická zdravotnícka pomôcka <i>in vitro</i>		Jednorazový obal po použití vyhodiť do príslušnej zbernej nádoby
	Obmedzenie teploty		Výrobca		Zelený bod
	Dátum výroby		Kód dávky		Recyklovateľný obal
	Chrániť pred slnkom		Katalógové číslo		Varovanie
	Pozitívna kontrola		Obsah postačuje na n skúšok		Cut off kontrola
	Konjugát HRP		Negativna kontrola		Kyselina sírová
	Vymývací roztok		Substrát TMB		Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom
			Zried'ovací roztok		

Odporúčania na spracovanie súprav na ELISA automatoch.

Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v návodoch pre spracovanie súprav.

Odporúčame zabezpečiť aby substrát v automate neboli vystavený svetlu a aby sa tým eliminovala možnosť jeho znehodnotenia (zmodranie na svetle). Odporúčame mať počas spracovania súpravy zatvorený hlavný kryt automatizovaného systému.

Pre každé spracovanie súpravy použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií. Ak už vzniknú prebytky z predchádzajúcich meraní (napr. vymývacieho roztoku, štandardov ...) neodporúčame na ďalšie použitie aj keď boli uskladnené v chlade.

Pred samotným spracovaním v automatizovanom systéme je dôležité dodržať odporúčania ohľadne vytemperovania substancií (vplyv na presnosť merania) a mikrotitračnej platničky (eliminovať možnosť kondenzátu po vybratí z uskladnenia v chlade).

Substancie používať iba v rámci príslušnej šarže a súpravy (nesmú sa miešať substancie medzi rôznymi šaržami)

Odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov v rámci spracovania súpravy v automatizovanom systéme či korešponduje s odporúčaným postupom uvedeným v návode (hlavne po fáze premývania by mala byť hned pridaná príslušná substancia - konjugát, substrát). V prípade nesúladu konzultovať správne programové nastavenia so servisným technikom.

Skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania súpravy v automatizovanom systéme – napr. nevšimnutie si, že sú zlepnené prívodné hadičky spôsobí zlé premýtie platne.