



Návod na použitie

ELISA anti-LAKTÓZA-II-G

Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro určená na profesionálne použitie

REF E-471

UDI-DI 08588002310508



Biogema, výrobné družstvo, Košice

Garbiarska 2, 040 01 Košice, Slovenská republika

Tel.: +421 556 225 719

+421 904 228 131

E-mail: biogema3@biogema.sk

www.biogema.sk



OBSAH

| | |
|---|----|
| 1 Záznamy o dokumente | 3 |
| 2 Účel určenia | 3 |
| 3 Popis | 3 |
| 4 Princíp testu | 3 |
| 5 Zloženie súpravy | 4 |
| 6 Materiál potrebný, ale nedodávaný | 5 |
| 7 Skladovanie a doba expirácie | 5 |
| 8 Upozornenie | 5 |
| 9 Príprava vzoriek | 7 |
| 10 Príprava pracovných roztokov | 7 |
| 11 Pracovný postup | 7 |
| 12 Pipetovacia schéma | 8 |
| 13 Kontrola kvality a validácia testu | 9 |
| 14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy | 9 |
| 15 Interpretácia výsledkov | 10 |
| 16 Parametre analytického výkonu | 11 |
| 17 Odporúčania pri práci so súpravou | 11 |
| 18 Zoznam použitých symbolov | 13 |
| 19 Literatúra | 14 |

1 Záznamy o dokumente

Revízia č.: 1/2024

Dátum účinnosti: 1.1.2024

Popis zmien: Úpravy a doplnenie podľa aktuálnych požiadaviek

2 Účel určenia

Súprava je určená na semikvantitatívne stanovenie protilátok typu IgG proti antigénu komplexu laktóza-proteín vo vzorkách ľudského séra v bežnej populácii. Stanovenie protilátok je založené na imunoenzymatickej metóde a slúži ako rozšírenie diagnostických možností intolerancie kravského mlieka. Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

3 Popis

Laktóza alebo mliečny cukor je disacharid, ktorý tvorí 2-8 % pevných látok v mlieku. Kravské mlieko patrí do skupiny potenciálnych potravinových alergénov, ktoré vyvolávajú u precitlivených jedincov chorobné stavy charakterizované abnormálnou imunitnou odpoveďou.

V ELISA súpravách sa využíva fakt, že ak sa laktóza, ako haptén naviaže na proteín vzniká komplex, ktorý následne vyvoláva imunitnú odpoveď (non-IgE mediovaná reakcia). Prepúšťanie komplexov haptén-proteín a celkovo nutrientov do krvi pacienta súvisí s priepustnosťou čreva a zápalovými ochoreniami čriev.

4 Princíp testu

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariedeného 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 odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB 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.

5 Zloženie súpravy

PLATE Mikrotitračná doštička potiahnutá antigénom **1 ks**

12x8 jamkové stripy umiestnené v rámy, zabalené v ochrannom obale s vysúšadlom.

CONJUGATE Konjugát HRP anti-IgG **1 x 12 ml**

Roztok obsahujúci zvieraciu protilátku proti ľudskému IgG značenú peroxidázou.

Roztok je pripravený na použitie.

SUBSTRATE Substrát TMB **1 x 8 ml**

Roztok obsahujúci substrát TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín).

Roztok je pripravený na použitie.

STOP Kyselina sírová **1 x 8 ml**

Roztok obsahujúci zastavovacie činidlo (zriedenú kyselinu sírovú).

Roztok je pripravený na použitie.

CONTROL CO Kontrolná vzorka cut off **1 x 1 ml**

Roztok obsahujúci špecifické ľudské protilátky IgG proti komplexu laktóza-proteín slúžiaci ako kontrola cut off.

Kontrolná vzorka cut off je pripravená na použitie.

CONTROL - Kontrolná vzorka negatívna **1 x 1 ml**

Roztok neobsahujúci špecifické ľudské protilátky IgG proti komplexu laktóza-proteín slúžiaci ako negatívna kontrola.

Kontrolná vzorka negatívna je pripravená na použitie.

CONTROL + Kontrolná vzorka pozitívna **1 x 1 ml**

Roztok obsahujúci špecifické ľudské protilátky IgG proti komplexu laktóza-proteín slúžiaci ako pozitívna kontrola.

Kontrolná vzorka pozitívna je pripravená na použitie.

SAMPLEBUF Zried'ovací roztok **1 x 100 ml**

Roztok obsahujúci TRIS-HCl tlmivý roztok, boviný sérový albumín, 0,2% azid sodný, 0,02% timerosal a modré farbivo, pH roztoku $7,0 \pm 0,2$.

Roztok je pripravený na použitie.

WASHBUF Vymývací roztok **1 x 50 ml**

Uhlčitanový tlmivý roztok s obsahom Tween 20 a 0,01% timerosalu, pH roztoku 9,6.

Koncentrovaný roztok pred použitím zriedte podľa popisu v bode 10 tohto návodu.

Osvedčenie o súprave **1 ks**

6 Materiál potrebný, ale nedodávaný

Pre ručné spracovanie súpravy:

Jedno a viacnásobné pipety

Špičky pre jednorazové použitie

Premývacie zariadenie

Časovač alebo stopky

Spektrofotometer pre mikrotitračné doštičky

Pre automatizované spracovanie súpravy:

Automatizovaný systém na spracovanie súprav ELISA

Jednorazový materiál podľa požiadaviek automatizovaného systému

7 Skladovanie a doba expirácie

Pri dodržaní skladovacích podmienok je súprava stabilná do dátumu uvedenom na obale. Súpravu skladujte pri teplote od +2°C do +8°C na suchom mieste. Súpravu nezmrazujte. Po otvorení ochranného obalu mikrotitračnej doštičky odporúčame stripy spotrebovať do 1 mesiaca.

8 Upozornenie

Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

Pozorne si prečítajte návod na použitie.

Pre správne spracovanie súpravy je potrebné vykonať všetky kroky presne podľa návodu na použitie.

Nepoužívajte mikrotitračnú doštičku, ak je ochranný obal poškodený.

Pred spracovaním súpravu vytemperujte na laboratórnu teplotu, t.j. na 18°C až 25°C.

Priložené vysušadlo v ochrannom obale mikrotitračnej platničky nepoužívať.

Súprava je určená len na jedno použitie.

Pomoc a vigilancia

Pre žiadosť o technickú pomoc, alebo prípadný výskytu závažnej nehody kontaktujte výrobcu na emailovej adrese biogema4@biogema.sk, prípadne telefonicky na +42155 6228 131. Pri výskyte závažnej nehody je používateľ tejto súpravy povinný takúto udalosť nahlásiť aj na tel. čísle +421250 7012 15, e-mailom na pomocky@sukl.sk dozornému orgánu ŠÚKL, Kvetná 11, 825 08 Bratislava a vždy postupovať podľa regulačných požiadaviek v platnom znení.

Bezpečnosť pri práci

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 obsiahnutá v stop činidle **STOP** v koncentrácii $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ môže pri priamom kontakte s očami, alebo kožou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí, alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.

Azid sodný, timerosal a kyselina sírová, v koncentráciách použitých v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciiach súpravy životné prostredie nie je ohrozené. Podrobnejšie informácie je možné získať z kariet bezpečnostných údajov jednotlivých substancii.

Infekčné a mikrobiálne riziká

Kontrolné vzorky a štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancii vykazovalo negatívny výsledok testu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Napriek negatívne mu testovaniu použitých sér je potrebné s týmito substanciami pracovať ako s potenciálne infekčnými - pri práci používajte jednorazové ochranné rukavice.

Likvidácia odpadu

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál.

Nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame zlikvidovať v súlade s miestnymi požiadavkami a v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č.223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 365/2015 Z.z. v platnom znení.

Nekontaminovaný kartónový obal súpravy vhodte do príslušnej recyklačnej nádoby.

9 Príprava vzoriek

Súprava je určená na stanovenie vzoriek ľudského krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri teplote od +2°C do +8°C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri - 20°C. Vzorky séra po rozmrazení nie je možné opakovane zamraziť. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované, ikterické, alebo inak kontaminované krvné séra.

Pacientské séra sa riedia v pomere 1:101, t.j. 10 µl pacientského séra sa zriedi pridaním 1ml zriedovacieho roztoku. Takto zriedené pacientské séra sú pripravené na použitie.

10 Príprava pracovných roztokov

Vymývací roztok pred použitím zriedte v pomere 1:20 (1 diel roztoku a 19 dielov destilovanej vody). Obsah fľaštičky vymývacieho roztoku (50 ml) doplňte do 1000 ml destilovanou vodou. Roztok je po zriedení stabilný 1 týždeň pri skladovaní v teplotnom rozmedzí +2°C do +8°C.

Štandardy a kontrolné vzorky sú nariedené v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Konjugát HRP je nariedený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

TMB substrát je nariedený v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

Kyselina sírová je nariedená v pracovnom pomere, ďalej neriediť !

11 Pracovný postup

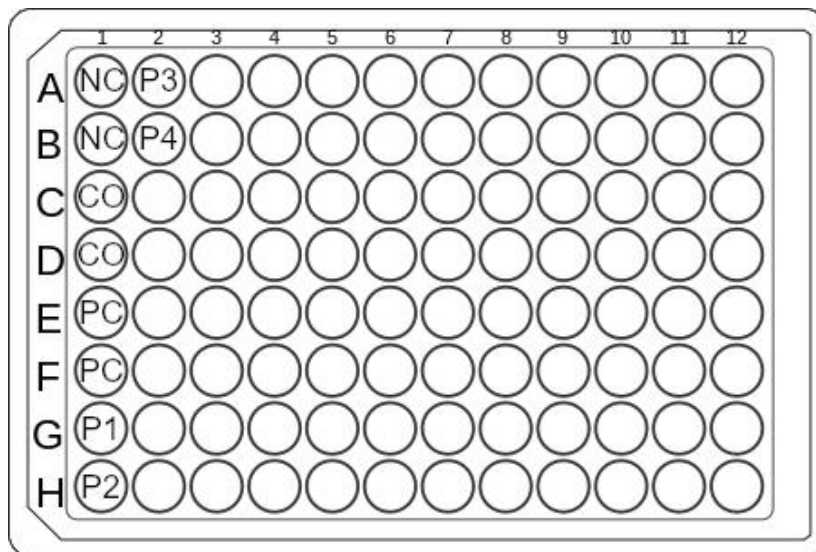
Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu +18°C až +25°C. Nepoužitú stripy uchovávajú v uzatvorenom obale s vysušadlom v teplotnom rozmedzí od +2°C do +8°C.

1. Pipetujte do jamiek stripov:
 - po 100 µl negatívnej kontrolnej vzorky
 - po 100 µl cut off kontrolnej vzorky
 - po 100 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
 - po 100 µl zriedených pacientských vzoriek
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote
3. Po ukončení inkubácie stripy 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii premývacie zariadenie pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní 250 µl zriedeného vymývacieho roztoku do všetkých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývací roztok zo stripov prudko vyleje a okraje doštičky sa usušia filtračným papierom.

4. Do jamiek napipetujte po 100 μ l konjugátu HRP anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
5. Stripy znova 4 x dobre premyte zriedeným vymývacím roztokom
6. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 50 μ l substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút !
7. Vyfarbuje sa 15 minút v tme.
8. Po uplynutí doby vyfarbenia sa reakcia zastaví pridaním 50 μ l kyseliny sírovej do každej jamky.
9. 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 do 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hodiny po skončení vyvíjania, doštičku medzitým uchovávajte v tme.

12 Pipetovacia schéma



| Označenie | Objem | Popis |
|---------------------|-------------|----------------------------|
| NC | 100 μ l | Kontrolná vzorka negatívna |
| CO | 100 μ l | Kontrolná vzorka cut off |
| PC | 100 μ l | Kontrolná vzorka pozitívna |
| P1 - P _x | 100 μ l | Zriedené patientské vzorky |

13 Kontrola kvality a validácia testu










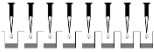

Absorbancia negatívnej kontrolnej vzorky by mala byť nižšia ako 0,5.

Absorbancia kontrolnej vzorky cut off by mala mať minimálne 2x hodnotu cut off.

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.

14 Zjednodušená pracovná schéma spracovania súpravy

| | | | |
|--|--|----------------------|--|
| 01. Pipetujte po 100 µl | /kontrolné vzorky, patientské vzorky/ | 100 µl |  |
| | CONTROL- CONTROL+ CONTROLCO | | |
| 2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote | | 30 min. 18 - 25°C |  |
| 3. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
| | WASHBUF | | |
| 4. Pipetujte po 100 µl | /konjugát HRP / | 100 µl |  |
| | CONJUGATE | | |
| 5. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote | | 30 min. 18 - 25°C |  |
| 6. 4x dobre premyte vymývacím roztokom | /250 µl, reakčný čas 30 s/ | 4 x |  |
| | WASHBUF | | |
| 7. Pipetujte po 50 µl | /substrát TMB/ | 50 µl |  |
| | SUBSTRATE | | |
| 8. Inkubujte 15 minút pri laboratórnej teplote v tme | | 15 min. 18 - 25°C |   |
| 9. Pipetujte po 50 µl | /Kyselina sírová/ | 50 µl |  |
| | STOP | | |
| 10. Vyhodnotenie výsledku | /fotometrický čítač s vlnovou dĺžkou 450 nm/ | 450 nm |  |

15 Interpretácia výsledkov

Vypočítajte priemerné absorbancie pre všetky kontrolné vzorky a patientské séra.

Vypočítajte index positivity podľa vzorca:

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

Očakávané hodnoty:

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne.

Odporúčame hodnotenie pomocou vypočítaných indexov positivity :

| | |
|---|-----------------|
| Index positivity negatívnych hodnôt | < 1 |
| Index positivity hraničných hodnôt | 1 – 1,3 |
| Index positivity pre pozitívne hodnoty | > 1,3 |

16 Parametre analytického výkonu

| | |
|----------------------------------|----------|
| Analytická citlivosť : | 0,012 IP |
| Opakovateľnosť (Intra-assay) | 5,69 % |
| Reprodukovateľnosť (Inter-assay) | 6,70 % |
| Presnosť | 8,35 % |

Súprava je špecifická pre ľudský imunoglobulín triedy IgG

17 Odporúčania pri práci so súpravou

Pri spracovaní súpravy odporúčame dbať na dôsledné vykonanie jednotlivých krokov definovaných v pracovnom postupe, ako je správne pipetovaný objem substancií, presné dodržanie inkubačných časov a dôsledné premytie a odsatie vymývacieho roztoku z jamiek v procese premývania. Nesprávne premytie mikrotitračných jamiek, prípadne vynechaný cyklus, či krok premývania, má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbancií.

Pred spracovaním súpravy odporúčame dbať na dobré vytemperovanie substancií a mikrotitračnej doštičky. Zlé vytemperovanie substancií má priamy vplyv na presnosť merania.

Pre prípravu vymývacieho roztoku používajte vysoko kvalitnú destilovanú vodu vhodnú na laboratórne použitie.

Pri spracovaní súpravy dbajte na dodržiavanie správnej laboratórnej praxe. Odporúčame používať jednorazové pipetovacie špičky. Pre pipetovanie každej substancie použite novú špičku pre elimináciu kontaminácie vzoriek a substancií.

Súpravu je možné spracovať postupne. Nepoužitú stripy uchovávať v hliníkovom ochrannom obale spolu s vysúšadlom podľa podmienok skladovania uvedených v tomto návode na použitie. Pre každé spracovanie súpravy odporúčame použiť a nariediť iba potrebné množstvo čerstvých substancií.

Neodporúčame používať už nariadené, alebo inak pripravené substancie, ktoré boli pripravené pre predchádzajúce spracovania (ani v prípade, ak boli uchovávané v chladničke).

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

Odporúčame zabezpečiť, aby substrát TMB nebol vystavený slnečnému žiareniu (prípadne umelému osvetleniu). Vaničku pre pipetovanie TMB roztoku nepoužívajte na iné substancie.

Odporúčania pri práci so súpravou v ELISA automatizovaných systémoch

Pri automatizovanom spracovaní súpravy odporúčame odsledovať časový priebeh jednotlivých krokov spracovania a prípadne nastaviť správne časové intervaly jednotlivých krokov (hlavne po fáze premývania by mala byť hneď pridaná príslušná látka - konjugát HRP, substrát TMB).

Odporúčame skontrolovať správny priebeh každého kroku spracovania - správne premytie, správne pipetovanie objemov, správny čas inkubácie a pod..





















Nastavenie teploty v automatizovanom systéme musí byť zabezpečené tak, aby bolo v súlade s odporúčanou teplotou uvedenou v tomto návode na použitie. Znížená a zvýšená teplota pri spracovaní súpravy má priamy vplyv na stanovené hodnoty absorbančností.

Odporúčame mať počas spracovania súpravy uzatvorený kryt automatu. Vystavenie substrátu TMB svetlu môže mať za následok znehodnotenie látky s priamym negatívnym dopadom na výsledok spracovania.

Súprava je vhodná pre spracovanie na všetkých typoch automatických ELISA analyzátoroch.

Pri nedodržaní pracovného postupu výrobca nezodpovedá za správnu funkciu súpravy.

18 Zoznam použitých symbolov

| | |
|---|--|
|  | Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro |
|  | Katalógové číslo |
|  | Šarža / LOT |
|  | Výrobca |
|  | Vhodné pre „n,, testov |
|  | Označenie zhody s regulačnými požiadavkami „CE,, |
|  | Obsahuje ľudské tkanivo |
|  | Obsahuje zvieracie tkanivo |
|  | Chráňte pred slnkom |
|  | Dátum expirácie |
|  | Obmedzenie teploty / Teplotný rozsah |
|  | Prečítajte si návod na použitie / elektronický návod na použitie |
|  | Nepoužívať opakovane |
|  | Varovanie |
|  | Nepoužívať, ak je obal poškodený |
|  | Distribútor |
|  | Vhodte do príslušnej zbernej nádoby |
|  | Materiálové zloženie HDPE |
|  | Materiálové zloženie PP |
|  | Materiálové zloženie papier a lepenka |

19 Literatúra

Anti-glycosyl antibodies. Two sets of isoantibodies with specificity for different carbohydrate moieties of the same glycosyl antigen, J H Pazur, K L Drescher, L S Forsberg, PMID: 416019, 1978

Antibody response to haptenic sugar antigen: immunodominancy of protein-bound lactose formed by amino-carbonyl reaction., T Matsuda, I Nakashima, Y Kato, R Nakamura, Affiliations expand, PMID: 3657787 DOI: [10.1016/0161-5890\(87\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0161-5890(87)90015-0), 1987

Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose, Ana Irene Ledesma-Osuna, Gabriela Ramos-Clamont and Luz Vázquez-Moreno, PMID: 18797521, 2008

Carbohydrate binding specificity of monoclonal antibodies raised against lactose-protein Maillard adducts, T Matsuda¹, H Ishiguro, I Ohkubo, M Sasaki, R Nakamura, PMID: 1587802, DOI: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123766](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123766), 1992