



## Návod na použitie

### ELISA anti-MILK-II-M semikvantitatívna

Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro určená na profesionálne použitie

**REF** E-243 SE

**UDI-DI 08588002310591**



**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](mailto:biogema3@biogema.sk)

[www.biogema.sk](http://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 IgM proti antigénu kravského mlieka vo vzorkách ľudského séra v bežnej populácii. Stanovenie protilátok je založené na imunoenzymatickej metóde a slúži k diagnostike intolerancie kravského mlieka. Súprava je určená len na profesionálne diagnostické použitie in vitro v laboratóriu.

## 3 Popis

Kravské mlieko patrí do skupiny potencionálnych potravinových alergénov, t.j. látok proteínovej povahy, ktoré vyvolávajú u precitlivených jedincov chorobné stavy charakterizované abnormálnou imunitnou odpoveďou.

Zvýšené hladiny špecifických protilátok IgM proti kravskému mlieku v ľudskom sére sú indikátorom potravinovej intolerancie, ktorá sa môže prejavovať kožnými symptómami (atopický ekzém, žihľavka) a gastrointestinálnymi symptómami (detské koliky, hnačky, zvracanie). Intolerancia kravského mlieka sa najčastejšie vyskytuje u novorodencov a detí do troch rokov. Stanovenie protilátok triedy IgM proti proteínom kravského mlieka tvorí dôležité vyšetrenie v diferenciálnej diagnostike tohto ochorenia.

## 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 IgM. 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 rámik, zabalené v ochrannom obale s vysúšadlom.

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

Roztok obsahujúci zvieraciu protilátku proti ľudskému IgM 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 IgM proti peptidom kravského mlieka slúžiaci ako kontrola cut off. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka cut off je pripravená na použitie.

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

Roztok neobsahujúci špecifické ľudské protilátky IgM proti peptidom kravského mlieka slúžiaci ako negatívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka negatívna je pripravená na použitie.

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

Roztok obsahujúci špecifické ľudské protilátky IgM proti peptidom kravského mlieka slúžiaci ako pozitívna kontrola. Koncentrácia je stanovená v osvedčení o súprave.

Kontrolná vzorka pozitívna je pripravená na použitie.

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

Roztok obsahujúci TRIS-HCl tlmivý roztok, bovinný 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**

Uhličitanový 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 vysúšadlo 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](mailto: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](mailto: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

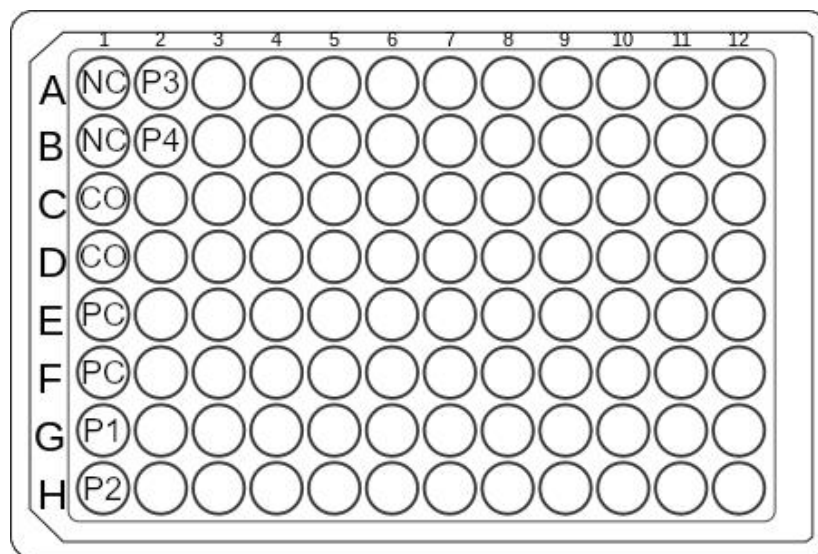
Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vytemperované na laboratórnu teplotu +18°C až +25°C. Nepoužitú stripy uchovávajú v uzatvorenom obale s vysušadlom v teplotnom rozmedzí od +2°C do +8°C.

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 µl konjugátu HRP anti-IgM 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 µl 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 µl 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 µl	Kontrolná vzorka negatívna
CO	100 µl	Kontrolná vzorka cut off
PC	100 µl	Kontrolná vzorka pozitívna
P1 - P <sub>x</sub>	100 µl	Zriedené patientské vzorky



## 13 Kontrola kvality a validácia testu






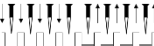





Absorbancia negatívnej kontrolnej vzorky by mala byť nižšia ako 0,5.

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

## 15 Interpretácia výsledkov

Vypočítajte priemerné absorbancie pre všetky kontrolné vzorky a patientske séra.

Vypočítajte index pozitivity podľa vzorca:

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

Očakávané hodnoty:

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

Odporúčame hodnotenie pomocou vypočítaných indexov pozitivity :

<b>Index pozitivity negatívnych hodnôt</b>	<b>&lt; 1</b>
<b>Index pozitivity hraničných hodnôt</b>	<b>1 – 1,3</b>
<b>Index pozitivity pre pozitívne hodnoty</b>	<b>&gt; 1,3</b>

## 16 Parametre analytického výkonu

Analytická citlivosť :	0,0077 IP
Opakovateľnosť (Intra-assay)	4,65 %
Reprodukovateľnosť (Inter-assay)	9,96 %
Presnosť	11,32 %

Súprava je špecifická pre ľudský imunoglobulín triedy IgM

## 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

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