

Návod k použití

**immuno^{LINE}
IgG₄Nutritional MX1/MX2/MX3**

Enzymatický imunologický test založený na nitrocelulóзовých testovacích proužcích
k detekci lidských protilátek IgG₄ proti
20 potravinovým antigenům
v séru a plazmě



Kat. č. **ILE-LBL11/12/13**
Pokyny pro skladování: 2-8 °C
Pouze pro diagnostické použití in-vitro

Říjen 2017

IMMUNOLAB GmbH, Otto-Hahn-Str. 16, D-34123 Kassel

Tel: +561 491742-0, Fax: +561 491742-20, e-mail: info@immunolab.de

Obsah

1. Informace o výrobku.....	4
2. Úvod.....	4
3. Princip testů.....	5
4. Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny.....	6
5. Složení soupravy.....	7
6. Distribuční schéma.....	9
7. Potřebný materiál, který není součástí soupravy.....	10
8. Odběr vzorků a manipulace.....	10
9. Pracovní postup.....	10
10. Hodnocení.....	11
11. Charakteristiky testu.....	13
12. Krátký návod.....	14
13. Literatura.....	15

Symboly

STRIP _□	Strip
CONJ	Konjugát
SAMP DIL	Diluent vzorku
WASH BUF	Promývací pufr
CONC	Koncentrát (<n>-násobný)
SUBS	Substrát

1. Informace o výrobku

Testovací soupravy IMMUNOLAB immuno^{LINE} IgG₄ Nutritional MX slouží k detekci specifických protilátek IgG₄ spojených s potravinovými antigeny v séru a plazmě. Možné další aplikace u jiných tělních tekutin, lze vyžádat od technického servisu společnosti IMMUNOLAB.

Tento test slouží výhradně k diagnostickému použití in vitro.

Laboratorní výsledky je možné interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních testů, anamnézou a klinickým obrazem pacienta.

2. Úvod

Reakce proti potravinám v důsledku inkompatibility můžou v lidském těle vést k různým příznakům. Toto narušení se v imunitním systému projeví tvorbou specifických protilátek třídy IgE i IgG a/nebo IgG₄.

Statistické analýzy ukazují, že 60 % populace trpí na intoleranci proti alespoň jedné potravině, které můžou vést ke klinickým příznakům nebo tyto příznaky zhoršovat. Znamky můžou být různé, od podráždění kůže přes zažívací potíže až po migrénu. Při zjištění nespecifického dyskomfortu je nutné vyloučit alergie nebo potravinové intolerance.

Teoretickým základem pro stanovení specifických protilátek třídy IgG nebo IgG₄ v diagnostice potravinových intolerancí je zjištění, že některé podtřídy IgG (hlavně IgG₄) jsou spojené s degranulací basofilů a mastocytů in vitro a aktivací komplementové kaskády. U atopiků byly zjištěny vysoké hladiny cirkulujících protilátek třídy IgG.

Již první studie prokázaly, že u osob se zánětlivými reakcemi proti potravinám jsou přítomné protilátky IgG, ne však IgE. U pacientů s potravinovými intolerancemi byly detekované také významně vyšší titry IgG a IgG₄.

Kožní testy vykazují relativně nízkou korelaci s potravinovými alergiemi a jsou významné pouze v přítomnosti reakcí spojených s IgE. Jako další diagnostické nástroje se používají provokační testy a eliminační diety. Tyto metody významně závisí na motivaci pacienta a jeho dodržování pokynů lékaře. Vzhledem k těmto omezením se v současnosti zvyšuje obliba serologických stanovení protilátek proti různým potravinovým panelům.

Časové charakteristiky těchto dvou reakcí spojených s imunitním systémem se liší: potravinové alergie spojené s IgE se rozvíjí v průběhu hodiny od požití jídla, kdežto IgG/IgG₄ intolerance vykazují opožděné reakce po 24 až 120 hodinách s rizikem vzniku trvalých příznaků.

3. Princip testů

Testovací soupravy IMMUNOLAB immuno^{LINE} IgG₄ Nutritional MX Lineblot jsou založeny na principu enzymatického imunologického testu (EIA). Každou soupravou lze otestovat 16 pacientů. Na každého pacienta je třeba použít jeden testovací proužek. Každý samostatný proužek obsahuje 20 různých potravinových antigenů a kontrolní linii pro vyhodnocení testu v paralelních liniích. Po předběžném navlhčení se proužky inkubují s naředěným pacientovým sérem. Protilátky IgG₄ séra se naváží na imobilizované potravinové antigeny. Po 30ti minutové inkubaci při pokojové teplotě se proužky opláchnou naředěným promývacím roztokem, aby se odstranil nenavázaný materiál. Poté se přidá konjugát anti-humánního IgG₄ a AP připravený k použití. Souprava se inkubuje dalších 30 minut při pokojové teplotě. Po dalším promývání se substrátový (BCIP/NBT) roztok napipetuje a inkubuje 60 minut při pokojové teplotě, včetně aktivace precipitačního barviva na liniích u pozitivní reakce. Barevná aktivace se ukončí opláchnutím proužků promývacím roztokem. Koncentrace protilátek IgG₄ je přímo úměrná intenzitě zbarvení.

4. Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny

- Pouze pro použití in vitro! Nepožívejte ani nepolykejte! Je nutné dodržovat obvyklá bezpečnostní opatření pro laboratorní práci a zákaz jídla, pití a kouření v laboratoři.
- Žádné z činidel nejsou založené na lidském materiálu. Se vzorky je však i tak nutné manipulovat jako s potenciálně infekčním materiálem a dodržovat bezpečnostní opatření jako použití latexových rukavic.
- Rozlité sérum a reagencie je třeba setřít za použití dezinfekčního roztoku (např. 5% chlornanu sodného) a náležitě zneškodnit.
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu (18 až 25 °C).
- Před pipetováním by se všechny reagencie měly důkladně promíchat šetrným nakláněním nebo kýváním lahvičky. Vyhněte se dynamickému třepání, které vede k tvorbě pěny.
- Pipetujte v konstantních intervalech, aby měly všechny kanály inkubačního nosiče stejné podmínky.
- Při dávkování reagencií z lahviček se ujistěte, že nedošlo ke kontaminaci uzávěru. Vyvarujte se možného vzájemného smíchání reagencií. Obsah lahviček je často citlivý vůči oxidaci, proto se musí otevírat pouze na krátkou dobu.
- Aby nedošlo k přenosu nebo křížové kontaminaci, je nutné používat čisté jednorázové špičky na pipety.
- Všechny reagencie se musí spotřebovat do data jejich expirace.
- V souladu se správnou laboratorní praxí (SLP) a normou ISO 9001 by měly být veškeré používané laboratorní přístroje pravidelně kontrolovány z hlediska jejich přesnosti a spolehlivosti. Týká se to mimo jiné mikrolitrových pipet a dalších nástrojů (kupř. skener pro vyhodnocování testu).
- Dávejte pozor, aby nedošlo ke kontaktu určitých reagencií, hlavně substrátu, s kůží, očima a sliznicemi.

5. Složení soupravy

Díly	Objem/Množství
Potravinovým antigenem potažené mikrocelulóznové testovací proužky	16
Enzymatický konjugát	18 ml
Diluent vzorku	60 ml
Promývací pufr (10 x)	60 ml
Substrát	18 ml
Inkubační nosič	1
Skenovací šablona	1

Skladování a stabilita (viz data expirace na štítku krabičky)

Součásti soupravy uchovávejte při teplotě 2-8 °C. Po použití je třeba opět nasadit a utáhnout uzávěry lahvíček. Soupravu uchovávejte při teplotě 2-8 °C. Otevřenou soupravu je nutné spotřebovat do 6 měsíců.

Univerzální reagencie

Promývací pufr, diluent vzorku a substrát jsou stejné pro všechny screeningové lineblotové testovací soupravy IgG nebo IgG₄ Screen Nutritional od společnosti IMMUNOLAB s alkalickou fosfatázou jako detekčním enzymem. Lze je mezi produkty a šaržemi volně zaměňovat. Všechny ostatní reagencie přísluší ke konkrétní soupravě a šarži a nemohou se mezi sebou měnit.

5.1 Nitrocelulóznové testovací proužky

16 proužků pro 16 pacientů. Každý samostatný proužek je potažen 20 různými potravinovými antigeny (viz distribuční schéma) a jedním kontrolním antigenem. Připravené k použití.

5.2 Enzymatický konjugát

18 ml, antihumánní IgG₄-AP (myš), v pufovacím roztoku s obsahem proteinů. Přidání 0,01% methylisothiazolonu a 0,01% bromonitrodioxanu a 5 mg/l přípravku ProclinTM. Připravené k použití.

5.3 Diluent vzorku

60 ml, pufr PBS/BSA. Přídavek 0,05% azidu sodného. Připravené k použití.

5.4 Promývací pufr

60 ml, TBS + Tween 20, 10x koncentrát. Konečná koncentrace: naředí se v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát se na 15 minut zahřeje na 37 °C. Naředěný promývací pufr lze uchovávat při teplotě 2-8 °C po dobu 4 týdnů.

5.5 Substrát

18 ml, BCIP/NBT. Připravené k použití.

5.6 Inkubační nosič

8 kanálů pro inkubaci 8 proužků.

5.7 Skenovací šablona

5.8 Návod k použití

6. Distribuční schéma

Jedna kontrolní linie je spolu s 20 potravinovými alergeny k detekci protilátek nízké klinické závažnosti distribuovaná na testovacím proužku v následujícím pořadí.

	IgG₄ Nutritional MX1
CL	Kontrola
1	Vaječný žloutek
2	Vaječný bílek
3	Kravné mléko
4	Kozí mléko
5	Kasein
6	Veprové
7	Kuřecí
8	Krůtí
9	Jehněčí
10	Telecí
11	Treska
12	Losos
13	Tuňák
14	Síh
15	Krab
16	Garnát
17	Slávka jedlá
18	Káva
19	Kakao
20	Zázvor

	IgG₄ Nutritional MX2
CL	Kontrola
1	Pšenice
2	Oves
3	Rýže
4	Kukuřice
5	Lepek
6	Droždí
7	Jablko
8	Maliny
9	Hrozny
10	Pomeranč
11	Cintón
12	Grapefruit
13	Mango
14	Ananas
15	Banán
16	Vodní meloun
17	Cantaloupe (Ananasový meloun)
18	Datle
19	Olivy
20	Zelená paprika

	IgG₄ Nutritional MX3
CL	Kontrola
1	Mandle
2	Kokos
3	Cashew
4	Kaštan
5	Arašidy
6	Soja
7	Fazole
8	Čočka
9	Dýně
10	Okurek
11	Červená paprika
12	Rajče
13	Brokolice
14	Špenát
15	Žampiony
16	Mrkev
17	Celer
18	Brambory
19	Cibule
20	Česnek

7. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- Mikropipety
- Zkumavky k naředění séra (volitelné)
- Rocker
- Podtlakové čerpadlo
- Deionizovaná voda

8. Odběr vzorků a manipulace

Pro stanovení se může použít především sérum nebo plazma (EDTA, heparin). Sérum se po vysrážení a centrifugaci oddělí od krve, která byla sterilně odebrána ze žíly. Vzorky séra či plazmy se mohou uchovávat zchlazené (při 2-8 °C) až po dobu 7 dnů. Pro delší skladování se musí uchovávat při teplotě -20 °C. Vzorky by se neměly opakovaně zmrazovat a rozmrazovat. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.

Před provedením testu je nutné vzorky naředit v poměru 1:51 s diluentem vzorku připraveným k použití (kupř. 20 µl séra + 1 ml diluentu vzorku). Na otestování 20 antigenů postačuje pouze 20 µl séra na pacienta.

9. Pracovní postup

9.1 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok

Před použitím se naředí v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát se na 15 minut zahřeje na 37 °C.

- Pro spolehlivé provedení testu se doporučuje postupovat důsledně podle protokolu. Za veškeré změny a modifikace odpovídá uživatel.
- Všechny reagentie a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.

Provedení testu

1. Uložte požadované množství testovacích proužků do inkubačního nosiče. Viditelné značky na jednotlivých testovacích proužcích musí být směřované nahoru.
2. Do každého kanálu aplikujte 1 ml diluentu vzorku a inkubujte testovací proužky na rockeru po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté roztok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla.

3. Do každého kanálu nosiče aplikujte 1 ml vzorku naředěného v poměru 1:51 a inkubujte testovací proužky na rockeru po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté roztok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla.
4. Poznámka: Pro snadnější manipulaci může být vzorek přímo zředěn v inkubačním kanálu. V tomto případě aplikujte 1 ml diluentu vzorku do kanálu a přidejte 20 µl vzorku. Ihned po přidání vzorku začněte třepat.
5. Do každého kanálu aplikujte 2 ml naředěného promývacího roztoku a promývejte testovací proužky nejméně po dobu 2 minut na rockeru při pokojové teplotě. Poté roztok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla. Tento krok zopakujte celkem 3x.
6. Do každého kanálu aplikujte 1 ml konjugátu připraveného k použití a inkubujte testovací proužky na rockeru po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté roztok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla.
7. Zopakujte krok promývání dle popisu v bodu 4.
8. Do každého kanálu aplikujte 1 ml substrátu připraveného k použití a inkubujte testovací proužky na rockeru po dobu 60 minut při pokojové teplotě. Poté roztok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla.
9. Do každého kanálu aplikujte 1 ml naředěného promývacího roztoku a ukončete tak reakci substrátu. Rostok aspirujte pomocí podtlakového čerpadla.
10. Testovací proužky vysušte na vzduchu a vyhodnoťte.

Poznámka: Rychlost rockeru používaného ve všech inkubačních krocích závisí na geometrii daného přístroje. Validační experimenty ukázaly, že rychlost > 90/min u běžných zařízení vedla ke spolehlivým výsledkům.

10. Hodnocení

Vlhké testovací proužky mohou vykazovat určité barvení pozadí, které schnutím vymizí. Z toho důvodu se proužky vyhodnocují, pouze když jsou zcela suché.

Nezapomínejte, že některé vzorky vykazují barvení pozadí, které schnutím nevymizí. V takovém případě se mohou v poloze potažené antigeny objevit bílé proužky. Tyto signály interpretujte jako negativní.

Některé vzorky vykazují velmi slabé reakce na více antigenů. Nelze zcela vyloučit, že tyto vzorky budou mít tendence vykazovat nespecifické reakce. V takovém případě je třeba je považovat za negativní pro všechny antigeny s podobně slabými reakcemi.

Test považujte za validní, když během inkubace substrátu vznikne jasně viditelná kontrolní linie. Tato linie se objeví, i když budou všechny potravinové antigeny mít

negativní výsledek. Kontrolní linie je nejbližší signál k identifikačnímu kódu, který je na testovacím proužku přímo vytištěn.

10.1 Vizuální metoda

Kontrolní linie vysušených testovacích proužků je zarovnána s označením na šabloně („CL“). Čísla 1-20 označují polohu potažených antigenů dle pořadí uvedeného v části „Distribuční schéma“. Signály se u všech antigenů interpretují dle následujícího schématu:

Třída	Signál	Interpretace
0	žádný signál nebo slabý signál u více antigenů	negativní
1	slabý signál	hraniční výsledek
2	střední signál	pozitivní výsledek
3	intenzivní signál	silně pozitivní výsledek

10.2 Metoda skeneru

IMMUNOLAB immuno^{LINE} IgG₄ Nutritional MX Lineblot testy mohou být vyhodnoceny pomocí skeneru v kombinaci s IMMUNOLAB's immuno^{LINE} Evaluation Tool softwarem k získání kvantitativních výsledků. Přečtěte si prosím návod k použití softwaru.

11. Charakteristiky testu

Spec. IgG₄ Lineblot	Vaječný bílek	Kravné mléko	Pšenice	Arašíd
Přesnost v rámci testu	8,9 – 16,5 %	4,4 – 8,2 %	4,3 – 24,4 %	8,9 – 14,6 %
Přesnost mezi testy	3,6 – 25,7 %	3,5 – 16,5 %	5,1 – 29,1 %	2,0 – 10,3 %
Přesnost mezi šaržemi	5,4 – 34,4 %	4,5 – 18,6 %	5,1 – 29,1 %	2,0 – 10,3 %
Záchyt	105 – 113 %	120 – 129 %	90 – 107 %	90 – 107 %
Linearita	93 – 119 %	93 – 111 %	116 – 127 %	97 – 114 %
Zkřížená reaktivita	Bez zkřížené reaktivity vůči jiným izotopům Ig			
Interference	Bez interference s bilirubinem do 0,3 mg/ml, hemoglobinem do 8,0 mg/ml a triacylglyceridy do 5,0 mg/ml			
Klinická specifická	93 %	88 %	95 %	91 %
Klinická senzitivita	96 %	94 %	94 %	94 %

12. Krátký návod

1. Reakce: Diluent	1 ml	Diluent vzorku
	5 min ↓ při pokojové teplotě	
2. Reakce: Sérum	1 ml	Sérum pacienta (naředěno v poměru 1:51)
	30 min ↓ při pokojové teplotě	
	Promyjte 3x, 2 ml promývacího pufru (naředěn 1:10)	
3. Reakce: Konjugát	3x2 min ↓ při pokojové teplotě	
	1 ml	Konjugát (připraven k použití)
	30 min ↓ při pokojové teplotě	
4. Reakce: Substrát	Promyjte 3x, 2 ml promývacího pufru (naředěn 1:10)	
	3x2 min ↓ při pokojové teplotě	
	1 ml	Substrát (BCIP/NBT, připraven k použití)
	60 min ↓ při pokojové teplotě	
	1 ml	Promývací pufr (naředěn 1:10)
	↓	
	Vyhodnoťte	

13. Literatura

1. Aas K: The diagnosis of hypersensitivity to ingested foods. *Clinical Allergy* 1978; 8:39-50.
2. AMA Council on Scientific Affairs, In Vitro Testing for Allergy. Report II of the Allergy Panel Council on Scientific Affairs. *JAMA*, 1987, 258(12):1639-43.
3. AMA Council on Scientific Affairs, In Vivo Diagnostic Testing and Immunotherapy for Allergy. Part I, *JAMA*, 1987, 258:1363-7.
4. Bleumink E: Food Allergy; The chemical nature of the substance eliciting symptoms. *World Reviews in Nutrition and Diet* 1970; 12:505-570.
5. Bübl, R. Schön, B., Rakoski, J.: Allergenspezifische IgG-Antikörper bei Atopikern; *Allergologie* 16, 7, 299-304 (1993).
6. Canadian Paediatric Society, Allergy Section. Blood Tests for Allergy in Children. *Can Med Assoc J*, 1990, 142(11):1207-8.
7. Cohen, G.A., Hartmann, G., Hamburger, R.N., O'Connor, R.D.: Severe anemia and chronic bronchitis associated with a markedly elevated specific IgG to cow's milk protein; *Annals of Allergy* 55, 38-40 (1985).
8. Devey, M.E., Wilson, D.V., Wheeler, A.W.: The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay-fever patients during hyposensitization; *Clin. Allergy* 6, 227 (1976).
9. Durham, S.R., Lee, T.H., Cromwell, O., Shaw, R.J., Merret, T.G., Merret, J., Cooper, P, Kay, A.B.: Immunologic studies in allergen-induced late-phase asthmatic reactions; *J. Allergy Clin Immunol* 74, 49 (1984).
10. Djurup, R., Osterballe, O.: IgG subclass antibody response in grass pollen-allergic patients undergoing specific immunotherapy; *Allergy* 39, 433-441(1984).
11. Rowntree, S., Platt-Mills, T.A.E, Cogswell, J.J, Mitchell E.B.: A subclass IgG₄-specific antigen-binding Radioimmunoassay (RIA): Comparison between IgG and IgG₄ antibodies to food and inhaled antigens in adult atopic dermatitis after desensitization treatment and during development of antibody responses in children; *J. Allergy Clin. Immunol* 80, 622-630 (1987).
12. Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D.R., Smith, E., Fairburn, E.: Elevated serum IgG and IgG₄ in patients with atopic dermatitis; *Br. J. Derm*: 97, 59-63 (1977).
13. Wojdani, A., Etesami, S., Cheung, G.P.: IgG is not the only inhibitor of IgE in the RAST test; *Annals of Allergy* 55, 463-468 (1985).
14. Wüthrich, Brunello: Neurodermitis atopica (atopische Dermatitis) in Fuchs/Schulz, *Manuale Allergologicum V*, 14, 21-22.

Poznámky

Souprava je distribuována společností TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

V případě dotazů nás kontaktujte.

Tel: +420 541 248 311

Email: info@testlinecd.cz