

Zestaw Total IgE ELISA

Zestaw do ilościowego oznaczania całkowitej IgE

Kod produktu GD09

96 testów

Odczynniki zawarte w zestawie są wyłącznie do użytku *in vitro*



1. Przeznaczenie

Zestaw Total IgE jest czułą metodą ELISA do wykrywania przeciwciał klasy IgE. Jest on przeznaczony jako pomoc w diagnostyce atopii u dzieci i dorosłych. Elementy zestawu są wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

2. Wstęp

Immunoglobulina E ma budowę podobną do immunoglobulin innych klas. Posiada dwa specyficzne miejsca wiążące antygen przymocowane do stałego regionu (Fc). Znaczenie biologiczne IgE w surowicy nie jest znane. Wywiera swoje działanie tylko wtedy kiedy połączy się z bazoofilami lub mastocytami. Mediatory uwolnione z tych komórek są odpowiedzialne za natychmiastową reakcję nadwrażliwości.

Mechanizmy regulujące syntezę IgE różnią się od tych z innych klas. Stężenia w surowicy są na ogół niskie u zdrowych osób. Poziom wzrasta w okresie dzieciństwa osiągając między 15 a 20 rokiem życia stężenie występujące u osób dorosłych. Ponieważ stężenia IgE są zazwyczaj niskie dlatego swoista odpowiedź IgE na alergen będzie często powodować znaczny wzrost poziomu całkowitej IgE.

Test został wykalibrowany względem the Second International IgE Reference Serum: 75/502 (IU/ml). Podwyższony poziom całkowitej IgE wyraźnie wskazuje na atopowe predyspozycje ale nie daje wskazówki co do przyczynowego czynnika. Podwyższony poziom stwierdzono u pacjentów z chorobą pasożytniczą, tropikalną eozynofilią i podczas niektórych reakcji polekowych.

Pomiar całkowitej IgE jest najbardziej pomocny w diagnostyce chorób atopowych u małych dzieci. U dorosłych istnieje nakładanie się pomiędzy atopowymi a normalnymi. Wartości do 120 IU/ml są wartościami dla normalnej populacji. Większość pacjentów z chorobami atopowymi ma wartości powyżej 120 IU/ml. Nie występują różnice w normalnym stężeniu IgE ze względu na płęć.

3. Zasada metody

Rozcieńczone próbki surowicy są inkubowane z monoklonalnymi przeciwciałami przeciw ludzkiej IgE unieruchomionymi na wgłębieniach mikroplastyki. Po wypłukaniu niezwiązanych składników surowicy, dodawane są monoklonalne mysie przeciwciała przeciwko ludzkiej IgE znakowane peroksydazą chrzanową. Podczas drugiej inkubacji wiążą się one z powierzchniowo związanymi IgE. Niezwiązany koniugat jest usuwany w trakcie płukania. Następnie, w celu wykrycia związanych specyficznych przeciwciał, dodawany jest roztwór substratu zawierający 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę (TMB). Dodanie roztworu zatrzymującego reakcję kończy i zapewnia odpowiednie pH dla koloru. Gęstość optyczna wzorców, substancji kontrolnych i próbek jest mierzona za pomocą czytnika mikroplastyki przy długości fali 450 nm.

4. Materiały zawarte w zestawie

- **Mikroplastyka:** 96-dokłowa w rozdzielanych paskach 12 X 8, pokryta wstępnie monoklonalnymi przeciwciałami anti-IgE, z uchwytem, w woreczku foliowym zawierającym środek osuszający.
- **Odczynnik 1: Rozcieńczalnik próbki** 10mM zbuforowany roztwór białka, pH 7.2 ze środkiem przeciwbakteryjnym, 50ml, (niebieski), gotowy do użycia
- **Odczynnik 2: Koncentrat buforu płuczącego** (x10), 100mM roztworu soli fizjologicznej buforowanej Tris z detergentem, pH 7.2, 100 ml
- **Odczynnik 3: Koniugat** mysie przeciwciała przeciw ludzkiej IgE znakowane peroksydazą chrzanową w białkowym roztworze stabilizującym i środku przeciwbakteryjnym, 12 ml, (czerwony), gotowy do użycia
- **Odczynnik 4: Substrat TMB** wodny roztwór TMB i nadtlenu wodoru, 12 ml, gotowy do użycia,
- **Odczynnik 5: Roztwór zatrzymujący reakcję** 0,25M kwasu siarkowego, 12 ml, gotowy do użycia

- **Wzorce:** 0, 50, 150, 375, 1250 IU/ml, 1ml 10mM roztworu soli fizjologicznej buforowanej Tris zawierającej IgE ludzkiej surowicy, gotowy do użycia
- **Kontrolna pozytywna:** 1ml 10mM roztworu soli fizjologicznej buforowanej Tris zawierającej IgE ludzkiej surowicy, gotowy do użycia.

• Instrukcja użycia

5. Inny potrzebny sprzęt

1. Probówki do rozcieńczania • cylinder do przygotowania roztworu buforowego • pipety precyzyjne i jednorazowe końcówki do odmierzania 10µl, 100µl, 1ml • płuczka do mikroplastyki EIA lub pipeta wielokanałowa lub tryskawka • woda destylowana lub dejonizowana • papier chłonny • czytnik mikroplastyki EIA z filtrem 450nm i opcjonalnie z filtrem referencyjnym 620nm. Jako alternatywę, można też zastosować odpowiedni system automatyczny.
2. Oprzyrządowanie, zarówno ręczne jak i automatyczne, powinno spełniać następujące kryteria: pipety o nieprecyzyjności 3% lub lepszej, bez możliwości przenoszenia zawartości między etapami odmierzania; płuczki powinny usuwać z mikroplastyki 99% cieczy; urządzenia automatyczne powinny minimalizować czas pomiędzy płukaniem i dodawaniem kolejnego odczynnika.

6. Środki ostrożności

6.1 Środki bezpieczeństwa

1. Wszystkie odczynniki w tym zestawie służą jedynie do celów diagnostycznych *in vitro*.
2. Badanie powinno być wykonywane jedynie przez doświadczony personel laboratoryjny. Należy ściśle przestrzegać protokołu badań.
3. Cały materiał pochodzenia ludzkiego użyty do przygotowania wzorców i substancji kontrolnych dla niniejszego produktu został zbadany i nie znaleziono w nim przeciwciał dla HIV, HbsAg i HCV. Jednakże żadna metoda badania nie może dać absolutnej pewności, że czynniki zakaźne są nieobecne. Wobec tego wszystkie odczynniki zawierające materiał ludzki powinny być traktowane, jak potencjalnie zakaźne. Osoby posługujące się nimi powinny nosić rękawice i odzież ochronną zawsze, gdy mają do czynienia z surowicą pacjentów lub produktami na bazie surowicy.
4. Odczynniki w tym zestawie zawierają środki antybakteryjne, natomiast roztwór substratu zawiera 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. Jeśli dojdzie do takiego kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody.
5. Roztwór zatrzymujący reakcję zawiera 0,25M kwasu siarkowego. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. Jeśli dojdzie do takiego kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody.
6. Każda ciecz, która miała kontakt z materiałem potencjalnie zakaźnym musi zostać wylana do pojemnika ze środkiem odkażającym. Usuwanie takiej cieczy musi odbywać się zgodnie z lokalnymi przepisami.

6.2 Techniczne środki ostrożności

1. Paski i roztwory nie powinny być używane, jeśli torebka foliowa była uszkodzona lub wyciekły ciecz.
2. Przed użyciem doprowadzić wszystkie odczynniki i mikroplastyki do temperatury pokojowej. Upewnić się, że woreczek z mikroplastyką, zawierający wszystkie nie używane paski, jest szczelnie zamknięty i ma środek osuszający dla uniknięcia wilgoci. Po użyciu przechowywać w temperaturze 2 - 8°C.

- Do każdej serii badań dołączyć kontrolę pozytywną aby monitorować stabilność odczynników i prawidłowe wykonanie testu.
- Ścisłe przestrzegać podanych czasów i temperatury inkubacji.
- Korzystając z urządzeń automatycznych, należy wziąć pod uwagę dodatkową ilość potrzebną do ustawienia przyrządów oraz objętość martwą pipety robota.
- Dopilnować, aby nie dochodziło do wzajemnego zanieczyszczenia pomiędzy dołkami. Przechowywać wszystkie pipety i inny sprzęt używany do Koniugatu całkowicie z dala od odczynnika Substratu.
- Pipetując Koniugat lub Substrat TMB, aby uniknąć wielokrotnego wprowadzania końcówek pipety do butelek z odczynnikami, należy użyć ilość płynów będącą wielokrotnością ilości dołków podczas badania. Nigdy nie wlewać niewykorzystanych odczynników z powrotem do butelek.
- Nie dopuszczać do wysychania studzienek reakcyjnych pomiędzy kolejnymi etapami inkubacji.
- Ścisłe przestrzegać opisanej procedury płukania. Niewystarczające płukanie może powodować wysoki sygnał tła.
- W czasie wszystkich etapów inkubacji unikać wystawiania na bezpośrednie działanie słońca i źródeł ciepła.
- Nakładać kolorowo oznaczone nakrętki na właściwe fiołki, aby uniknąć wzajemnego zanieczyszczenia.
- Ważne jest, aby bez zwłoki rozdzielać wzorce, substancje kontrolne i próbki do odpowiednich dołków mikroplątki. Dlatego należy pilnować, aby wszystkie próbki były gotowe do rozdzielania.

7. Okres i warunki przechowywania

Po dostarczeniu przechowywać zestaw w temperaturze 2 - 8°C. Po otwarciu zestaw zachowuje stabilność przez 3 miesiące (lub do osiągnięcia daty ważności jeśli jest mniejsza niż trzy miesiące). Nie stosować zestawu po upływie daty ważności. Nie zamrażać żadnego komponentu zestawu. Rozcieńczony bufor płuczający można przechowywać przez 3 miesiące w zamkniętej butelce, w temperaturze 2 - 8°C.

8. Zbieranie i przechowywanie próbek

Próbki surowicy lub osocza można wykorzystywać i przechowywać długoterminowo w temperaturze -20°C. Zamrożone próbki należy po rozmrożeniu i przed przystąpieniem do badań dobrze wymieszać. Powtarzające się zamrażanie i rozmrażanie może wpłynąć na wyniki. Dodanie środka konserwującego do próbki surowicy może negatywnie wpłynąć na wyniki. Nie należy używać próbek zanieczyszczonych mikrobiologicznie, poddanych obróbce cieplnej lub zawierających zanieczyszczenia nierozpuszczone. Należy unikać używania próbek w dużym stopniu zhemolizowanych, żółtaczkowych lub lipemicznych.

9. Przygotowanie odczynników

Rozcieńczyć koncentrat bufora płuczającego (**Odczynnik 2**) 1:9 w wodzie destylowanej, aby uzyskać wystarczającą ilość buforu do przeprowadzenia testu, np. dodać 50ml koncentratu bufora płuczającego do 450ml wody.

10. Procedura oznaczania

Przygotować ilość pasków potrzebną do badania

- Nalażyć 100 µl każdego standardu i kontroli pozytywnej. Nalażyć 20 µl każdej badanej próbki. Nalażyć 80 µl rozcieńczalnika do próbek do każdego dołka zawierającego próbkę pacjenta (aby uzyskać rozcieńczenie 1:5). Stuknij gwałtownie płytką aby wymieszać zawartość studzienek.
- Inkubować przez **60** minut w temperaturze pokojowej. W czasie wszystkich etapów inkubacji unikać wystawiania na bezpośrednie działanie słońca oraz bliskości wszelkich źródeł ciepła.
- Po upływie 60 minut zlać lub odciągnąć zawartość studzienek i przepłukać dołki 3 razy wykorzystując płukanie automatyczne lub procedurę płukania ręcznego (zob. poniżej). Dokładne wypłukanie jest kluczowe dla uzyskania

właściwych wyników. **Nie dopuścić do wyschnięcia dołków.**

Procedura płukania ręcznego:

Opróżnić dołki odwracając je. Przy pomocy pipety wielokanałowej lub tryskawki napędzić dołki roztworem buforowym. Opróżnić dołki przez odwrócenie i osuszyć papierem absorbującym. Powtórzyć ten proces jeszcze 2 razy.

- Nalażyć 100 µl Koniugatu (**Odczynnik 3**) do każdego dołka. Inkubować dołki przez **30** minut w temperaturze pokojowej.
- Po upływie 30 minut usunąć zawartość dołków i uważnie wypłukać je 4 razy przy pomocy roztworu buforowego. Dopilnować, aby dołki były puste, ale nie wyschły.
- Nalażyć 100 µl Substratu TMB (**Odczynnik 4**) do każdego z dołków. Inkubować płytkę przez **10** minut.
- Nalażyć 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję (**Odczynnik 5**) do każdego dołka. Czas reakcji, roztwór zatrzymujący reakcję powinien być dodawany do dołków w takiej samej kolejności jak Substrat TMB.
- Przed upływem 10 minut odczytać gęstość optyczną (OD) każdego dołka przy pomocy filtra 450nm na czytniku mikroplątek. Jako referencyjną długość fali można użyć filtra 620nm.

11. Kontrola jakości

Dane dotyczące kontroli jakości są podawane na Certyfikacie Jakości, osobnym dla każdej partii i dołączonym do zestawu.

Kontrola pozytywna jest przeznaczona do monitorowania znaczących błędów odczynników.

Każdy dołek dający wynik pozytywny w spektrofotometrze, ale bez widocznego koloru, powinien zostać wyczyszczony od spodu i ponownie odczytany. Jeśli obserwowane wartości gęstości optycznej (OD) są mniejsze od zera, należy zweryfikować użyte długości fal, wyzerować czytnik wobec powietrza i powtórzyć pomiar.

12. Interpretacja wyników

Korzystając z 4 parametrowej krzywej logistycznej wykreślić wartość OD dla każdego wzorca względem jego stężenia. Wartości powyżej 1250 IU / ml należy oznaczyć jeszcze raz stosując większe rozcieńczenie próbki.

Zakresy referencyjne

Poniższe normalne zakresy (średnia + 2 odchylenia standardowe) podane są tylko dla orientacji. Każde laboratorium powinno zawsze ustalić własne zakresy referencyjne. Czynniki geograficzne mogą wpływać na wyniki.

Wiek	Wartość (IU / ml 75/502)
Noworodki	<11
Do 3 miesięcy	<25
Od 3 do 12 miesięcy	<37
1 do 5 lat	<135
5 do 10 lat	<144
Dorośli	<188

Pacjenci z wartościami IgE poniżej powyższych poziomów wiekowych posiadają niskie prawdopodobieństwo choroby atopowej. Wyniki należy interpretować w powiązaniu z innymi informacjami klinicznymi dotyczącymi każdego pacjenta. Czulość testu

Minimalne wykrywalne stężenie całkowitej IgE jest 0,9 IU/ml

13. Ograniczenia procedury

- Wyniki tego oznaczenia należy interpretować w połączeniu z danymi klinicznymi i historią pacjenta.
- Odpowiedź IgE jest krótkotrwała. Pacjenci, którzy nie mieli ostatnio atopowych zmian mogą mieć niskie poziomy IgE.
- Wyniki tego testu nie są diagnostycznym dowodem na obecność lub brak choroby atopowej.

14. Charakterystyka testu

Precyzja Inter-assay

	IgE IU/ml	CV%
Sample A	497	3.0
Sample B	614	3.1
Sample C	2013	4.7

Precyzja Intra-assay

CVs typically <12%

Liniowość

Kolejne rozcieńczenia surowicy dały liniową odpowiedź

Rozcieńczenie	IgE zmierzone	IgE przeliczone
Nierozcieńczona	784	784
1:1	387	774
1:2	191	764
1:4	98	784

Podsumowanie metody

- Nałożyć 100 µl standardów i kontroli pozytywnej
- **Nałożyć 20 µl każdej próbki badanej**
- Nałożyć 80 µl rozcieńczalnika próbek do każdego wgłębienia zawierającego próbkę badaną (**Odczynnik 1**)
- Inkubować przez **60** minut w temperaturze pokojowej
- *Przepłukać dołki 3 razy*
- Nałożyć 100 µl Koniugatu (**Odczynnik 3**) do każdego dołka
- Inkubować przez **30** minut w temperaturze pokojowej
- *Przepłukać dołki cztery razy*
- Nałożyć 100 µl Koniugatu (**Odczynnik 3**) do każdego dołka.
- Nałożyć 100 µl Substratu TMB (**Odczynnik 4**) do każdego dołka.
- Inkubować przez **10** minut w temperaturze pokojowej.
- Nałożyć 100 µl roztworu zatrzymującego reakcję (**Odczynnik 5**) do każdego dołka.
- Odczytać gęstość optyczną przy 450nm (pojedyncza długość fali) lub 450/620nm (podwójna długość fali).

Literatura dotycząca tego tematu

Pollart SM, Smith TF, Morris EC, et al. Environmental exposure to cockroach allergens: analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays. J Allergy Clin Immunol 1991;87:50510.

Chapman MD. Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. Allergy 1988;43:714.

Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, et al. Increased sensitivity and specificity of a sandwich **ELISA** for measurement of **IgE** antibodies. J Immunol Methods 1985;78:21726.

Kemeny DM, Urbanek R, Samuel D, et al. The use of monoclonal and polyspecific antibodies in the **IgE** Sandwich **ELISA**. J Immunol Methods 1986;87:4550.

G · E · N · E · S · I · S
Diagnos

A subsidiary Company of



Eden Research Park, Henry Crabb Road,
Littleport, Cambridgeshire CB6 1SE, UK
Tel. +44(0)1353 862220 Fax +44(0) 1353 863330
email: genesis@elisa.co.uk www.elisa.co.uk

Dystrybucja w Polsce:

NEXTER Sp. z o.o.
ul. Gromadzka 59
40-771 Katowice
Tel 32 2571 301; Fax 32 2514 113
www.nexter.pl
e-mail: nexter@nexter.pl