

Pracovní postup RISA – plněná deska



In vitro diagnostikum



+2 až +8°C



Viz. obal



Viz. obal

Popis:

Alergie je nepřiměřená reakce imunitního systému organismu na látky, se kterými se běžně setkáváme v našem prostředí. Je způsobena nesprávnou aktivací protilátek ze skupiny imunoglobulinu E (IgE) vlivem daného alergenu. Spektrum projevů alergických reakcí je velmi široké, od banální rýmy až po anafylaktický šok, který může končit i smrtí.

U člověka bylo rozlišeno pět tříd imunoglobulinů. Rozdíl je zakotven ve složení těžkých (H) řetězců, které se označují písmeny řecké abecedy: γ , α , μ , δ , ϵ ; lehké (L) řetězce jsou u všech tříd stejné, a to dva typy (κ , λ). Imunoglobulin E (IgE) má molekulovou hmotnost 188 000; obsahuje 14% sacharidů. Po svém vzniku je velmi rychle a velmi pevně vyvázan na povrchu mastocytů. Proto jeho koncentrace v séru je nepatrná. Při kontaktu s antigenem (alergenem) dochází k degranulaci mastocytů a bazofilů a následné uvolnění vasoaktivních aminů (histamin, serotonin).

Fyziologická úloha IgE spočívá pravděpodobně v ochraně slizničních povrchů, tím že uvolňuje v místě ataky mediátory a efekторы, které navodí zánětlivou reakci. Infekční agens, které prolomí IgA obranu se dostane do styku s IgE na povrchu mastocytů, což spustí jejich degranulaci a uvolnění vasodilatačních a chemotaktických faktorů.

Fyziologická koncentrace: 0 - 200 kU/l (mění se s věkem)

Hladina IgE v séru postupně vzrůstá během prvního roku života a následně pokračuje v pomalém tempu do té doby, než dosáhne hladiny IgE dospělého člověka (3). Nejběžnější příčiny narůstajících hodnot IgE v séru jsou atopická onemocnění a parazitické infekce. Pokud se atopičtí jedinci, mající protilátky IgE na specifický alergen, znovu setkají s tímto specifickým alergenem, může to u nich vyvolat širokou škálu symptomů. Symptomy přímo souvisí s degranulací mastocytů a mohou způsobit slzení očí, kýčání, kopřivku a otoky. Vážnost symptomů může v některých případech způsobit smrt. Identifikace specifického alergenu umožní pacientovi vyvarovat se styku s alergenem a zahájit vhodnou léčbu.

Účel použití:

Produkt je určen ke stanovení přítomnosti specifického IgE ve vzorku.

Doporučené skladování výrobku:

Doporučená teplota skladování je od +2°C do +8°C.

Souprava obsahuje:

- Mikrotitrační destičku osazenou alergeny v jamkách naplněných stabilizačním roztokem, umístění alergenů v jednotlivých jamkách odpovídá přiložené objednávce
- Návod k použití
- Objednávku

K provedení testu je dále potřeba (souprava neobsahuje):

Allercoat 6 Conjugate pack, Doverton Ltd., (katalogové číslo 22000)

Allercoat 6 Reference Set, Doverton Ltd., (katalogové číslo 22001)

Princip testu:

Testované sérum je inkubováno v jamce s papírovým diskem na jehož povrchu jsou navázány alergeny. Pokud analyzované sérum obsahuje IgE protilátky proti těmto specifickým alergenům, tyto protilátky se pak váží specificky na alergenní disk. Disk je následně v jamce po této inkubaci promyt a zbaven zbytků séra. Během další inkubace dojde k vazbě antiséra proti lidskému IgE značeného alkalickou fosfatázou na promytý disk. Následuje další promytí. Přidáním substrátu vzniká žluté zbarvení vznikající enzymatickou činností alkalické fosfatázy a PNPP. Následuje přidání stop roztoku, intenzita žlutého zbarvení odpovídá množství specifického IgE ve vzorku. Měření se provádí spektrofotometricky při 405nm

Varování a doporučení:



1. Diagnostikum pro in vitro použití
2. Skladovací roztok obsahuje stopové množství azidu sodného
3. Stop roztok obsahuje NaOH, MSDS lze poskytnout na vyžádání
4. S komponentami lidského původu je nutno zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem, tento materiál byl negativní na přítomnost antigenu HbSag (HBV), protilátek proti HCV, HIV 1,2.

Doporučený biologický materiál:

Pro analýzy je doporučeno používat sérum, alternativně plasmu. Neřaděné vzorky mohou být skladovány v +2° až +8°C maximálně jeden týden, pokud jsou uloženy tak, aby nedocházelo k vypařování či kontaminaci. Pro dlouhodobé skladování je doporučeno vzorky zamrazit. Vyhněte se opakovanému zamrazování a rozmrazování. Skladování při pokojové teplotě je možné maximálně po dobu 8 hodin.

Příprava roztoků a vzorků

Vzorky i reagenty před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu („room temperature“ dále jen „RT“). Před zpracováním vzorky homogenizovat (vortex)!


Příprava promývacího roztoku:

10 ml koncentrovaného promývacího roztoku doplnit do 500 ml deionizovanou H₂O. Takto připravený roztok vystačí na promytí jedné destičky. Při skladování koncentrovaného roztoku v chladu může dojít k vykrystalizování solí, vytemperováním se však krystaly rozpustí a koncentrovaný zásobní roztok lze použít k přípravě promývacího roztoku.

Příprava substrátového roztoku:

1 tabletu PNPP (20 mg) rozpustit v 13,5 ml substrátového pufru cca 15 minut před použitím. Při rozpouštění tablet je vhodné roztok bránit před světlem! Takto připravený roztok je určený pro okamžitou spotřebu a nesmí se skladovat pro opakované použití!

Příprava desky:

 Riziko přemístění alergenových disků (vypadnutí z příslušných jamek, přemístění do jiné jamky) při neopatrném odstraňování krycí folie! Při odstranění je nutné desku vytemperovat na RT a intenzivně 3x poklepat o pevnou podložku, aby se všechny disky přemístily na dna jednotlivých jamek. Po odstranění krycí folie je nutné desku 1x promýt promývacím pufrem!

Vlastní postup zpracování:

Inkubace se vzorkem:

Pipetovat 50µl kalibrátorů, pozitivních, negativních kontrol a neředěných vzorků do jamek podle pipetovacího protokolu. Jamka pro blank zůstává prázdná. Inkubovat **60 minut při 37°C s třepáním** (doporučen přístroj Shaker Termostat, PST-60HL, BIOSAN, 400 RPM).

Promytí:

Automatická promývačka je nezbytná pro promytí. Promýt všechny jamky 4x 350 µl ředěného promývacího pufru, "soak time" 40 sec. Jehly promývačky musí být nastaveny tak, aby nedošlo k poškození alergenových disků. Pozor: Nedostatečné promytí (např. méně než 4 cykly, redukované množství promývacího pufru nebo zkrácená doba "soakování") může způsobit falešný nárůst O.D hodnot.

Inkubace s konjugátem:

Pipetovat 50µl enzymového konjugátu (alkalickou fosfatázou značené anti-lidské IgE) do všech jamek s výjimkou blanku. Inkubovat **60 minut při 37°C s třepáním** (400 RPM, PST-60HL, BIOSAN).

Promytí:

Promýt desku 8x s 350 µl pufru se stejným "soak time" jako při prvním promytí.

Inkubace se substrátem:

Pipetovat 100 µl substrátového roztoku do všech jamek. Inkubovat **15 minut při 37°C s třepáním** (400 RPM, PST-60HL, BIOSAN) nebo 30 min bez třepání při **37°C** (chránit před slunečním světlem).

Zastavení reakce:

Pipetovat 100 µl stop roztoku do všech jamek ve stejném pořadí a stejnou rychlostí jako u substrátového roztoku.

Měření:

Fotometrické měření barevné intensity provádět při 405 nm a referenční vlnové délce 620-650 nm ihned po zastavení reakce (nejdéle do 30 minut). Před měřením je třeba desku protřepat..

Poznámky pro zpracování:

1. Referenční disky po vyjmutí z kazet vložit se do příslušných jamek podle rozpisu. Je třeba dbát na správné zasunutí disků na dno.
2. Laboratoř by v rámci kontroly kvality měla do každé analýzy zahrnout negativní kontrolu (komerční kontrolní sérum), laboratoř by měla zároveň použít s každou analýzou i pozitivní kontrolu.
3. **Diagnostika léků:** U alergenů, které jsou vázány přes HSA se hodnocení provádí výpočtem poměru, který je uveden níže. **Je zapotřebí, aby hodnota O.D. disku s alergenem byla 2x vyšší než hodnota absorbance disku se samotným HSA.** Hodnocení u těchto alergenů se pak provádí takto:

$$A = \frac{\text{O.D.séra (disk s alergenem)}}{\text{O.D. séra (disk s HSA)}}$$

Je-li A větší než 2, je výsledek pozitivní, je-li menší než 2 je negativní.

Pozn: pokud je O.D. v jamkách při stanovení léků nižší než nejnižší standard, potom test nelze vyhodnotit!

Koncentrace standardů jsou voleny tak, aby jednotlivé standardy určovaly hranici mezi jednotlivými třídami RAST.

| IU / ml | < 0,35 | 0,35-0,7 | 0,7-3,5 | 3,5-17,5 | 17,5-50 | 50-100 | >100 |
|---------|-----------|----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| RAST | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| | negativní | hraniční | slabě pozitivní | pozitivní | silně pozitivní | velmi silně pozitivní | velmi silně pozitivní |



Dynex Laboratories, s.r.o
Na Čihadle 32
Praha 6, 160 00
Tel.: +420 220 303 600
office@dynex.cz