

RISA – pracovní postup

Příprava roztoků a vzorků

Vzorky se vytemperují na pokojovou teplotu (dále RT)
Před aplikací vzorků je nezbytné vzorky homogenizovat!
Reagencie je třeba před zahájením prací také vytemperovat na RT

Příprava promývacího roztoku:

10 ml koncentrovaného promývacího roztoku se doplní do 500 ml bidestilovanou vodou. 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.

Substrátový roztok:

1 tableta PNPP (20 mg) se rozpustí ve 13,5 ml substrátového pufru cca 15 minut před použitím. Při rozpouštění tablet je vhodné roztok bránit před světlem! Roztok se nedá skladovat pro další použití!

Pracovní postup

1. Před testováním je vhodné připravit testovací schéma ve formátu mikrotitrační destičky, kde bude u každé jamky vyznačeno číslo vzorku a značka alergenu (disku). Pro alergeny, které jsou vázány přes HSA, je nezbytné nasazovat kontrolní „blankové“ vzorky s HSA.
2. Referenční a testovací disky se po vyjmutí z kazet osuší o filtrační papír a vloží se do příslušných jamek podle rozpisu. Je třeba dbát na správné zasunutí disků na dno. Do blankových jamek se disky nekládají žádné. Blank a standardy se připravují dvojmo. Do jednotlivých jamek destičky se aplikuje po 50 µl standard, kontrol nebo vzorků. Standardy ani séra se neředí!
3. Destičky se zakryjí víčkem a inkubují se 2 hod při RT za mírného třepání na orbitální třepačce nebo 1 hod při 37 st.C. Pokud není k dispozici permanentní třepání, je nutno destičky protřepat manuálně alespoň jednou po aplikaci vzorků a standard a pak ještě jednou až dvakrát během inkubace.
4. Destičky se promyjí 4 x 300 µl promývacího roztoku. Je třeba zajistit, aby roztok v jamkách zůstal vždy alespoň 40 sec a před posledním odsátím nechat roztok v jamkách 5 min.
5. Do všech jamek vyjma blanku se přidá po 50 µl enzym konjugátu.
6. Destičky se zakryjí a inkubují jako v bodě 3.
7. Destičky se promyjí 6 x 300 µl promývacího roztoku jako v bodě 4.
8. Do všech jamek včetně blanku se přidá po 200 µl substrátového roztoku.
9. Destičky se zakryjí a inkubují se na orbitální třepačce při RT. (Dobu inkubace je možné empiricky upravit tak, aby hodnota O.D. u nejvyšší standardy nepřekročila hodnotu 2.000.)
10. Kinetické měření: reakce se nezastavuje a měří se 60 minut po přidání substrátu.
11. Endpoint měření: po 30 minutách se do všech jamek přidá 100 µl stop roztoku.
12. Měření na destičkovém fotometru při vlnové délce 405 nm a 630 nm referenční vlnové délce. (V případě výskytu sraženiny ve STOP roztoku tento roztok centrifugujte a normálně použijte).

Hodnocení

Od průměrných hodnot O.D. standard , kontrol a vzorků se odečte průměrná hodnota BLANKU. Z takto získaných hodnot se sestrojí kalibrační křivka, která má sigmoidní charakter. Z ní se pak odečtou hodnoty specifického IgE.

U alergenů, které jsou vázány přes HSA je nutné od absorbance disku s alergenem odečíst hodnotu O.D. disku s HSA (nutno provádět pro každý vzorek zvlášť). 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.

Koncentrace standard 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	pozitivní	pozitivní	silně pozitivní	velmi silně pozitivní	velmi silně pozitivní

Schéma testu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	BLANK	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73
B	0,35	0,35	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74
C	0,7	0,7	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
D	3,5	3,5	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
E	17,5	17,5	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
F	50	50	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
G	100	100	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
H	NC	PC	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80