



diagnosticum Zrt.

H-1047 Budapest, Attila u. 126.

Tel.: +36-1-369-3684, +36-1-369-7913

Fax: +36-1-369-4383

CE

AlleN-G

ELISA reagenskészlet allergén fehérjék
-tej, tojás, szója, paradicsom, földimogyoró, búzaliszt-
ellen termelődt IgG ellenanyagok kimutatására
humán szérumból.

Kiszereles: 6 x 6 tesztsík

Gyári kódszám: Allen-G

EEKH nyilv. szám: HU/CA01/1986/04

A KÉSZLET TARTALMA:

Alapkészlet:

Kódszám: AlleN-G / alap

Az alapkészlet 6 x 6 tesztsíkon (288mérőhely) végzett vizsgálathoz szükséges reagenseket tartalmazza.

IgG negatív kontroll szérum (színtelen)	150 µl
Anti-humán IgG-HRPO konjugátum (sárga)	150 µl
PBS-Tween 20 mosó-hígító puffer (10x)	130 ml
TMB szubsztrát oldat	2x16 ml
0,25M kénsav	2x18 ml
Lezáró öntapadó lap	6 db

Tesztsíkok és kontrollok:

Megnevezés	Küszöb kontroll jelzése	Kódszám	Kiszereles
Tehéntej	Fehér	AlleN-G/milk	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll
Tojás	Zöld	AlleN-G/egg	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll
Szója	Piros	AlleN-G/soy	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll
Földimogyoró	Fekete	AlleN-G/peanut	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll
Paradicsom	Rózsaszín	AlleN-G/tomato	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll
Búzaliszt	Kék	AlleN-G/wheat	6 tesztsík + 100 µl küszöb kontroll

A VIZSGÁLAT ELVE:

Az AlleN-G ELISA reagenskészlet szilárdfázisú, enzimmel jelzett immundiagnosztikai módszeren alapuló teszt. Az eljárás során az élelmiszerfehérjével érzékenyített mikrotitráló lemez mikrokvettáitához kötött allergén (tisztított tehéntej-, tojás-, szója-, földimogyoró-, paradicsom-, és búzaliszt fehérje) a vizsgálati szérum-, vagy plazmamintákban lévő allergén specifikus IgG ellenanyagokkal reagál. A keletkezett immunkomplexek a következő lépésben bemért, tormaperoxidázzal jelzett anti-human IgG monoklonális ellenanyaggal reagálnak, ezt követően pedig ez az enzimmel jelölt immunkomplex az enzime specifikus TMB szubsztrát oldattal színváltozás közben reagál. A keletkezett termék ELISA fotométeren 450nm-en mérhető. A színreakció intenzitása arányos a lemezen lejátszódó immunreakcióban képződött komplex mennyiségével. Az eredmények negatív ill. küszöb kontrollszérumokkal értékelhetők a mintában lévő specifikus ellenanyagok negatív szérumkontrollra vonatkoztatott relatív allergén specifikus ellenanyagszintje (RAE=relatív ellenanyag egység) alapján.

A MÉRÉS ELVÉGZÉSÉHEZ SZÜKSÉGES EGYÉB ANYAGOK ÉS KÉSZÜLÉKEK:

Ionmentes vagy desztillált víz.

5-40, 20-200, és 200-1000 µl-es automata pipetták.

Üvegedények a hígításhoz és méréshez.

37 °C-os termosztát.

ELISA fotométer, 450 nm-es színszűrővel.

A KIT TÁROLÁSA, KEZELÉSE:

A kit minden komponensét 2-8 °C-on kell tárolni.

Felhasználni, bontatlan állapotban, a címkén feltüntetett ideig szabad.

Felbontott komponensek minőségének megőrzése a felhasználó felelőssége, a gyártó erre garanciát nem vállal.

Egy órával a felhasználás előtt a szükséges komponenseket hagyjuk szobahőmérsékletre felmelegedni.

A vizsgálat megkezdéséig a titrálólemez szükséges mennyiségű tesztsíkjait se vegyük ki a fóliából, a maradék csíkokat, gondosan zárjuk vissza, lehetőség szerint forrasszuk vagy ragasszuk, mivel a tesztsíkokat érő nedvesség jelentős minőségromlást eredményezhet.

A hígított reagenseket ne tároljuk, ne használjuk fel későbbi vizsgálathoz!

A különböző gyártási számú készletek egyes komponensei nem helyettesíthetők egymással!

ELŐÍRÁS ÉS FIGYELMEZTETÉS:

A készlet némelyik komponense konzerválóként nátrium azidot, tiomersált és antibiotikumot tartalmaz. A kit humán szérumot tartalmazó komponensei HepatitisB-re, és C-re, ill. HIV1-2-re negatívak, de ettől függetlenül a kontrollokat és a mintákat potenciális biológiai veszélyforrásként kell kezelni és az erre vonatkozó általános laboratóriumi higiénés szabályokat be kell tartani: ne pipetázzuk szájjal, felhasználás közben ne együnk, ne igyunk, ne dohányozzunk, használjunk gumikesztyűt! Vigyázzon, hogy ne történhessen tűszúrás, hámsérülés, vagy nyálkahártyára fröccsenő anyag miatt önfertőződés. Munka után a használt eszközöket a vonatkozó szabályozásoknak megfelelő dekontaminálás után dobjuk el és mossunk kezet!

Különösen ügyeljünk a pipetta hegyek és a hígító edények tisztaságára, a szennyeződött komponensek nem használhatóak fel további mérésekhez. A vegyszer és mosószer maradványok gátolhatják, vagy beindíthatják a reakciót!

Megfelelő eredményt csak az előírások pontos betartása esetén kapunk!

Csak *in vitro* diagnosztikai célra használható, és kizárólag gyakorlott laboratóriumi szakember használhatja!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE:

1. HÍGÍTÁS, ELŐKÉSZÍTÉS:

- Készítsük el az assay tervét, az első mérőhelyeket tartsuk fenn a kontrollok számára.
- A 10x tömény PBS-Tween 20 mosó-hígító pufferből készítsünk ionmentes vagy desztillált vízzel 1:10 arányú, 1x tömény oldatot. Pl.: 2 sor használata esetén 5ml 10x tömény puffert 45ml ionmentes vagy desztillált vízzel hígítsunk.
- Készítsük el a negatív és küszöb kontroll szérumok 1:50 hígítását. Antigénenként 5 µl kontrollszérumot kell bemérni 245 µl 1x tömény mosó-hígító pufferbe.
- Készítsük el a vizsgálandó minták 1:5000 hígítását. A hígítást két lépésben érdemes elvégezni, antigénenként az alábbi mennyiségekkel: 1:100hígítás: 5µl mintaszérumot 495 µl 1x tömény mosó-hígító pufferben hígítsunk, majd ebből 1:50 arányú hígítást készítsünk következő módon: 5µl hígított mintaszérumot 245µl 1x tömény mosó-hígító pufferbe mérjük be.

2. MINTA FELVITEL:

- Mérjük be 100µl 1x tömény PBS puffert, és 100-100µl-t a negatív, ill. a küszöb kontrollszérumok hígításaiból az allergén tesztszíkok megfelelő mélyületeibe. Végezzünk párhuzamos méréseket, a negatív kontrollból legalább hármat.
- Mérjük be 100-100 µl-t a hígított vizsgálandó szérummintákból az allergén tesztszíkok további mélyületeibe. Ebben az esetben is érdemes párhuzamos méréseket végezni.
- Inkubáljuk a lemez sorait öntapadós fedőlemezzel lezárva 60 percig 37°C-on.

3. MOSÁS:

- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat.
- A maradék cseppeket papírvattával itassuk le.
- Mossuk a sorok mélyületeit négyszer 250-250 µl mosópufferrel.

4. KONJUGÁTUM FELVITEL:

- A konjugátumból a hígító pufferrel készítsünk 1:500 arányú hígítást. Pl.: 2 sor használata esetén 5µl tömény konjugátumot hígítsunk 2500µl-re.
- Mérjük be 100-100 µl-t a hígított konjugátumból a lemez mélyületeibe.
- Inkubáljuk a lemez sorait öntapadós fedőlemezzel lezárva 60 percig 37°C-on.

5. MOSÁS:

- Öntsük ki a lemez mélyületeiből a nem reagált anyagokat.
- A maradék cseppeket papírvattával itassuk le.
- Mossuk a sorok mélyületeit négyszer 250-250 µl mosópufferrel.

6. SZUBSZTRÁT REAKCIÓ:

- Mérjük be a sorok mélyületeibe 100-100 µl TMB szubsztát oldatot.
- Inkubáljuk szobahőmérsékleten, fénytől védve 30 percig.
- Mérjük be a lemez mélyületeibe 100-100 µl 0,25M-os kénsavat, a bemérést követően, a mérés előtt, ajánlatos a lemezt kissé megrezgetni.

7. MÉRÉS:

- Olvassuk le a fényelnyelési értékeket a kénsav bemérését követő 5 percen belül ELISA fotométeren 450 nm-en levegővel szemben. 630nm-es differenciál szűrő használata ajánlott.

6. ÉRTÉKELÉS:

A vizsgálat értékelhető, ha

- PBS puffer oldattal mért $OD_{450} < 0,2$
- A küszöbkontroll az I. allergénosztály megadott határai közé esik.

A minták relatív allergén ellenanyag egysége (RAE) a következő képlettel számítható:

$$RAE_M = M_{OD450} / NK_{OD450} \times RAE_{NK}$$

- RAE_M = a minta relatív allergén ellenanyag egysége
- M_{OD450} = a minta OD_{450} értéke
- NK_{OD450} = negatív kontroll OD_{450} értékének átlaga
- RAE_{NK} = a negatív kontroll relatív ellenanyag egysége: 10

A minták következő allergén osztályokba sorolhatjuk a relatív allergénspecifikus ellenanyag egysége (RAE) alapján:

- **Negatív: < 40 RAE**
- **I. osztály (gyenge pozitív): 40-70 RAE**
- **II. osztály (pozitív): 70-100 RAE**
- **III. osztály (erős pozitív): 100 < RAE**

7. Teljesítmény jellemzők:

7. 1. Intra-assay:	1. minta			2. minta	
	Absz.	CV%	RAE	Absz.	CV%
Tej, n=7	0,474	3,6	43,9	0,108	1,6
Tojás, n=7	0,595	2,4	51,3	0,116	1,9
Szója, n=7	0,270	2,4	60,0	0,045	5,3
Mogyoró, n=7	0,416	4,1	67,1	0,062	1,4
Paradicsom, n=7	0,268	2,0	59,5	0,045	3,5
Liszt, n=7	0,413	5,1	60,7	0,068	2,5

	RAE	CV%
Tej, n=5	54,7	4,8
Tojás, n=5	52,9	8,9
Szója, n=5	62,6	9,4
Mogyoró, n=3	58,2	5,3
Paradicsom, n=3	64,8	5,0
Liszt, n=3	66,3	3,4

Az inter-, és intra-assay adatok csak illusztrációk!

7. 2. Inter-assay:

A címkéken a következő szimbólumok találhatóak



In vitro diagnosztikai használatra



Gyártási szám



Lejáratási idő (év/hónap/nap)



Kódszám



Tárolási hőmérséklet



Biológiai veszély

IRODALOM

- Bock, S.A. (1991) Oral Challenge Procedures. In Food Allergy: Adverse Reaction to Food and Food Additives. D.D. Metcalfe, H.A. Sampson, and R.A. Simon, (eds) Blackwell Scientific Cambridge, MA, p81.
- Barnes, RMR., et al. (1988) Human serum antibodies reactive with dietary proteins. IgG subclass distribution. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87, 184.
- Lessoff, M.H., et al. (1991) IgG antibodies to food in health and disease. Allergy Proc. 12, 305.
- Haeney, M.R. (1994) Diagnostic tests in allergic disease. In Current Themes in Allergy and Immunology. G.P. Spickett and I. Lewin (eds) Royal College of Physicians, London p. 1-7.