

СКРИНИНГ ПИЩЕВЫХ АЛЛЕРГЕНОВ IgG4





Иммуноферментный анализ для количественного определения специфического иммуноглобулина класса G, подкласса 4 к пищевым компонентам в сыворотке или плазме человека с установленной количественной эталонной системой.

Specific IgG4 to 16, 24, 48, 96, 192 determination

Enzyme Immuno Assay for the quantitative determination of specific IgG4 antibodies to different food components in human serum or plasma.

Номер по каталогу:	13073-BVR	(Пищевая панель для детей раннего возраста) 16 опр.
	13035-B	(Скрининговая пищевая панель) 24 опр.
	13090-A	(Пищевые добавки панель) 24 опр.
	13076-BVR	(Педиатрическая пищевая панель) 24 опр.
	13074-BVR	(Панель для детей старшего возраста) 48 опр.
	13075-BVR	(Самые популярные продукты панель) 96 опр.
	13085-BVR	(Средиземноморская пищевая панель) 96 опр.
	13040-R	(Российская смешанная панель) 96 опр.
	13010-11&13020-12	(Российская расширенная смешанная панель) 192 опр.

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ

Номер по каталогу	REF	10106PG		96 определений
Номер по каталогу	REF	10105PG		192 определений
Номер по каталогу	REF	101010PG		960 определений
Номер по каталогу	REF	102040PG		6 постановок

Для *in vitro* диагностики
Регистрационное Удостоверение
№ФСЗ 2007/00940 от 05.05.2015г.



ВВЕДЕНИЕ

Очевидно, что иммуноглобулины (Ig) подкласса IgG4 играют важную роль в гуморальной иммунной реакции на пищевые антигены. Предположена взаимосвязь симптоматики IgE-опосредованных реакций с присутствием специфических IgG4 к пищевым аллергенам. В настоящее время определение специфических IgG4 к пищевым аллергенам представляется всё более значимым.

НАЗНАЧЕНИЕ

Скрининговый набор предназначен для определения антиген-специфических IgG4 к аллергенам в сыворотке или плазме крови.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип анализа данной тест-системы основан на методе ELISA (твердофазный иммуносорбентный анализ). Планшет для IgG4 пищевого скрининга сорбирован различными пищевыми аллергенами, каждый аллерген в отдельной ячейке (лунке). Разбавленная человеческая сыворотка или плазма инкубируется в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами. Специфические IgG4 из образца пациента связываются с сорбированными на твердой фазе антигенами. После добавления анти-IgG4 ферментного конъюгата образуется ферментативный комплекс антиген/IgG/анти-IgG-щелочной фосфатазы, связанный с твердофазной поверхностью. Количество связанных антител сопоставимо с количеством пероксидазы в соответствующей ячейке и инкубируется с раствором субстрата ТМБ (тетраметилбензидин), что приводит к развитию синей окраски. После применения стоп-раствора цвет меняется с синего на жёлтый. Оптическая плотность жёлтого цвета измеряется спектрофотометрически на длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм). В рамках диапазона измерений концентрация пищевых аллерген-специфических IgG4-антител пропорциональна интенсивности окрашивания.

РЕАГЕНТЫ

ТРИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ на 96; 192; 960 опр.

Анти-IgG4-ферментный конъюгат
Концентрат промывочного буфера
Раствор субстрата ТМБ
Стоп-раствор (9.5% H₃PO₄)
Буфер для разведения образцов

№ 10106PG

1 флакон x 11 мл
1 флакон x 30 мл
1 флакон x 12 мл
1 флакон x 6 мл
1 флакон x 11 мл

№ 10105PG

1 флакон x 22 мл
1 флакон x 30 мл
1 флакон x 22 мл
1 флакон x 12 мл
1 флакон x 22 мл

№ 101010PG

1 флакон x 110 мл
1 флакон x 250 мл
1 флакон x 110 мл
1 флакон x 55 мл
1 флакон x 110 мл

НАБОР КАЛИБРАТОРОВ И КОНТРОЛЕЙ

Калибраторы (25; 50; 100; 250; 500; 1000; 2500 Мкг/мл)
Положительный контроль
Отрицательный контроль

№ 12040PG

7 флаконов по 0.5 мл
1 флакон по 0.5 мл
1 флакон по 0.5 мл

СОРБИРОВАННЫЕ АЛЛЕРГЕНАМИ ПЛАНШЕТЫ

(Ингаляционная скрининговая панель) 16 опр.
(Скрининговая пищевая панель) 24 опр.
(Пищевые добавки панель) 24 опр.
(Педиатрическая пищевая панель) 24 опр.
(Панель для детей старшего возраста) 48 опр.
(Самые популярные продукты панель) 96 опр.
(Средиземноморская пищевая панель) 96 опр.
(Российская смешанная панель) 96 опр.
(Российская расширенная смешанная панель) 192 опр.

№ Планшета

13073-BVR
13035-B
13090-A
13076-BVR
13074-BVR
13075-BVR
13085-BVR
13040-R
13010-11 & 13020-12

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Пипетки на 10-100 мкл. и на 200-1000 мкл., многоканальная пипетка, одноразовые наконечники, пробирки для разведения образцов, таймер, микропланшетный фотометр (ридер), инкубатор, адгезивная плёнка для закрытия ячеек. По выбору: микропланшетный вошер.

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для данного анализа можно использовать сыворотку или плазму пациента. Для сохранения целостности образца никакие добавки или консерванты не требуются. Образцы, хранящиеся при 2-8°C, должны быть проанализированы в течение 48 часов. При невозможности провести анализ в течение 48 часов или если нужна транспортировка образца, образец необходимо закрыть и заморозить. Следует избегать повторного замораживания и размораживания образцов. Перед проведением анализа замороженные образцы следует разморозить при комнатной температуре (20-25°C) и тщательно перемешать осторожным переворачиванием пробирки перед анализом. Образцы должны быть разбавлены в пропорции 1:20 (500 мкл. сыворотки + 9,5 мл. буфера для разведения образцов). Использование гемолитических или липемических образцов не рекомендуется.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Все реагенты перед использованием довести до комнатной температуры (минимум в течение часа).

Буфер для разведения	готов к использованию
Конъюгат	готов к использованию
Калибраторы	готовы к использованию
Контроли	разбавить в соотношении 1:20 (раствор использовать в течение 24 часов)
ТМБ субстрат	готов к использованию
Стоп-раствор	готов к использованию
Промывочный раствор:	разведите 30 мл. концентрированного промывочного буфера водой высокой степени очистки (конечный объем 750 мл.). Полученный таким образом промывочный буфер можно использовать в течение одной недели при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Подготовьте протокол проведения анализа. Рекомендуется анализировать контроли в дубликате.
2. Разведите **образцы пациентов и контроли 1:20** буфером для разведения (500 мкл. образцов пациента + 9.5 мл. буфера для каждого планшета, 25 мкл. контроля + 475 мкл. буфера для разведения). Калибраторы готовы к использованию и не требуют разведения! В отдельную рамку поместите эталонный стрип и необходимое количество ячеек для контролей. Оставшиеся неиспользованные стрипы тщательно и герметично упакуйте в имеющийся пакет из фольги. Возьмите соответствующее количество планшетов для пациентов из имеющихся в наличии.
3. Внесите по 100 мкл. калибраторов и контролей, а также разведенные образцы пациентов в соответствующие ячейки (см. схему планшета).
4. Накройте стрипы и планшет плёнкой для предотвращения испарения и инкубируйте 1 час при 37°C.
5. После инкубирования проведите аспирацию растворов из всех ячеек и трижды их промойте, используя 500 мкл. промывочного раствора на каждую ячейку. Процедуру промывания можно проводить вручную или применяя промывочное устройство. Удалите остатки жидкости, промокнув планшеты салфеткой.
6. Внесите по 100 мкл. конъюгата в каждую ячейку и накройте планшет плёнкой. Инкубируйте 1 час при 37°C.
7. Промойте ячейки, как описано в шаге 5.
8. Внесите по 100 мкл. раствора субстрата ТМБ в каждую ячейку и накройте планшет плёнкой, инкубируйте 15 минут в темноте при комнатной температуре.
9. В хронологическом порядке внести 50 мкл. стоп-раствора в каждую ячейку и осторожно перемешать содержимое лунок, например, постучав по рамке. Ровно через 5 минут измерить оптическую плотность, используя ELISA Ридер, при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм).

СМЕХА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

0.5 мл сыворотки + 9.5 мл буфера для разведения
(для каждого планшета)
25 мкл. контроля + 475 мкл. буфера для разбавления

100 мкл неразбавленных калибраторов / контролей
100 мкл разведенных образцов пациентов

3-х кратное
промывание



1 час при 37°C

100 мкл конъюгата

3-х кратное
промывание



1 час при 37°C

100 мкл ТМВ субстрата



15 минут в темноте при
комнатной температуре

50 мкл Стоп раствора



измерение 450/620
нм, через 5 минут



ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для вычисления результатов рекомендуется использовать прошедшее валидацию программное обеспечение. Для расчета вручную строят график на основе значений оптической плотности (ОП) для шести калибраторов [Δ 450 нм – 620 нм] на полулогарифмической бумаге (абсцисса: \log ME IgG4/мл.; ордината: линейная ОП Δ 405 нм – 620 нм) для получения стандартной кривой. Концентрацию IgG4 в образце пациента определяют на основе этой стандартной кривой. Значение ОП откладывают по оси ординат, результат в МЕ/мл можно прочесть по оси абсцисс. Стандартная кривая и контроли должны соответствовать диапазону приемлемых значений, указанных в Сертификатах контроля качества, которые поставляются вместе с набором. В противном случае необходимо проверить условия проведения анализа и, вероятно, повторить анализ.

Внимание: Поскольку калибраторы не разбавлены, необходимо умножить результаты образцов и контролей на 20, чтобы получить концентрацию специфического IgG4, присутствующего в образцах пациента.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория определяла и оценивала собственные референсные диапазоны.

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЙ

Данный диапазон измерений определяет концентрации IgG4 между 500 мкг/мл и 50.000 мкг/мл.

РЕКОМЕНДАЦИИ

< 2000 мкг/мл IgG4 - **Пищу можно употреблять без ограничений.**

Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

> 2000 - 5000 мкг/мл IgG4 - **Один или два раза в неделю можно употреблять эту пищу, соблюдая ротацию.**

Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

> 5000 мкг/мл IgG4 - **Избегайте употребления в пищу данного продукта по крайней мере 3 месяца.**

Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

1 мкг/мл. \approx 1 нг/мл

Интерпретация результатов осуществляется только лечащим врачом или диетологом индивидуально для каждого пациента!!!

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость результатов

Вариабельность интра-анализа

Образец	Среднее значение [МЕ/мл]	Коэффициент вариации, %
1 (n=3)	> 3000	< 11
2 (n=3)	> 3000	< 21

ЛИНЕЙНОСТЬ

Анализ четырех случайным образом отобранных образцов сыворотки показал линейность методики ($\pm 20\%$) для трех последовательных разведений. Из-за гетерогенности образцов человеческой сыворотки или плазмы нельзя исключить различные результаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA: IgE and IgG Binding Epitopes on alpha-Lactalbumin and beta-Lactoglobulin in Cow's Milk Allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001, 126:111-118.
2. Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Vila L, Beyer K, Sampson HA: Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: Differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107:379-383.
3. Kruszewski J, Raczka A, Klos M, Wiktor-Jedrzejczak W: High Serum Levels of Allergen Specific IgG-4 (asIgG-4) for Common Food Allergens in Healthy Blood Donors. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1994, 42:259-261.
4. Zar S, Mincher L, Benson MJ, Kumar D: Foodspecific IgG4 antibody-guided exclusion diet improves symptoms and rectal compliance in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2005, 40:800-807.
5. Zar S, Benson MJ, Kumar D: Food-specific serum IgG4 and IgE titers to common food antigens in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005, 100:1550-1557.
6. Noh G, Ahn HS, Cho NY, Lee S, Oh JW: The clinical significance of food specific IgE/IgG4 in food specific atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2007, 18: 63-70.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. В соответствии со статьей 1 параграф 26 Европейского постановления 98/79/ЕС использование in-vitro диагностических медицинских приборов предназначено для обеспечения соответствия, эффективности и безопасности продукта производителем. Таким образом, процедуры анализа, информация, меры предосторожности и предостережения, указанные в инструкции по эксплуатации, должны соблюдаться неукоснительно. Набор может быть использован только так, как описано на стр. 1 (назначение).
2. Исследование должно проводиться в соответствии с данной инструкцией, которая содержит всю необходимую информацию, сведения о мерах предосторожности и предостережения. Использование тест-набора с анализаторами и аналогичным оборудованием должно быть подтверждено. Любые изменения в конструкции, составе процедуры исследования, а также любое использование в сочетании с другими продуктами, не одобренными производителем, не разрешены; пользователь сам несет ответственность за подобного рода изменения, приводящие к ложным результатам и другим инцидентам. Производитель не несет ответственности за результаты, полученные при зрительном анализе образцов, взятых у пациентов.
3. Набор предназначен для использования только обученным и квалифицированным в области лабораторной диагностики персоналом. Беременные женщины не должны проводить исследование.
4. Лабораторное оборудование должно поддерживаться в соответствии с инструкциями изготовителя, и перед использованием следует проверить корректность его функционирования.
5. Набор предназначен только для in-vitro диагностики. Используйте только один раз. Не используйте просроченные компоненты. Не используйте реагенты других поставщиков или компоненты наборов различных партий (если только это не указано на стр. 1) с этим набором.
6. Не используйте компоненты набора, если упаковка компонентов повреждена. Пожалуйста, перед использованием проверьте все возможные пути для удаления микробиологической контаминации. Сразу же плотно закройте крышку флакона, чтобы избежать микробиологического заражения. Не меняйте крышки флаконов с реагентами.

7. Набор следует использовать при температуре, указанной в схеме тестирования (см. стр. 4). Использование при более высоких или низких температурах может привести к значениям, не соответствующим диапазону контроля качества.
8. Процедура промывки является абсолютно необходимой. Неправильная промывка может привести к ошибочным результатам. Рекомендуется использовать многоканальную пипетку и автоматизированный промывочный аппарат.
9. Во избежание перекрёстной контаминации и ложноположительных результатов, рекомендуется выполнять все шаги пипетирования надлежащим образом. Используйте только чистые наконечники для пипеток, диспенсеры и лабораторный инвентарь.
10. Тестовые компоненты на основе человеческой сыворотки были протестированы с использованием метода, соответствующего требованиям директив ЕС на наличие антител к ВИЧ 1 / ВИЧ 2, анти-НВс и анти-НСV, а также антигена гепатита HBsAg и оказались отрицательными. Тем не менее, с материалом на основе сыворотки крови человека следует обращаться как с потенциально инфицированным (БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫМ).
11. Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин, инфекционный потенциал которого, по заявлению производителя, не известен. Мы рекомендуем обращаться с любым продуктом животного происхождения, как с потенциально инфицированным, из-за возможного появления не выявленных возбудителей инфекций.
12. Следует придерживаться следующих мер безопасности при обращении с реагентами:
 - Избегайте попадания в глаза, на кожу или на одежду (P262).
 - Не вдыхайте распыляемый раствор (P260). Дозирование должно производиться только с помощью специальных инструментов, но не ртом.
 - В случае проглатывания: прополоскать рот. Не вызывайте рвоту (P301/330/331).
 - При попадании на кожу (или волосы): немедленно удалите/снимите всю загрязненную одежду. Промойте кожу водой (P303/361/353).
 - При вдыхании: Выведите пострадавшего на свежий воздух и оставьте в покое в положении, наиболее удобном для дыхания (P303/340).
 - При попадании в глаза: в течение нескольких минут тщательно промывайте глаза водой. Если вы носите контактные линзы, снимите их при возможности. Продолжайте промывать глаза. (P305/351/338).
 - Не ешьте, не пейте и не курите во время проведения исследования. Не приближайтесь к еде и напиткам.
 - Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/защиту для глаз (P280). Тщательно мойте руки после работы (P264) и позаботьтесь о своей коже.
 - Сертификат безопасности материала доступен по запросу.
13. Стоп-реагент вызывает серьезные ожоги кожи (H315) и повреждение глаз (H319).
14. ТМБ в высоких концентрациях может быть потенциально мутагенным. В связи с низкой концентрацией ТМБ в этом растворе субстрата мутагенный эффект может быть исключен, если он правильно используется.
15. Консерванты (Bronidix, Thimerosal, Azid) являются токсичными для водной флоры и фауны, но их концентрация более не опасна для окружающей среды. Разведите реагенты большим количеством воды. Thimerosal (WashBuf B) может вызвать поражение органов при длительном или повторном воздействии (H373).
16. Отходы, содержащие сыворотку, должны быть собраны в отдельные контейнеры с соответствующими дезинфицирующими средствами в достаточной концентрации. С данным материалом следует обращаться в соответствии с государственными постановлениями о биологической безопасности и правилами и руководствами по технике безопасности.
17. Настоящим мы ссылаемся на государственные нормативы по медицинскому оборудованию, касательно in-vitro диагностических тест-наборов.

D R. F O O K E
Laboratorien GmbH Tel.: 0049-2131-2984-0
Habichtweg 16 Fax: 0049-2131-2984-184
4 1 4 6 8 Neuss
E-mail: information@fooke-labs.de
Internet: www.fooke-labs.de