

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 90 determination

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

- Номер по каталогу: 13045-A** Полный набор (Восточно-Кавказская пищевая панель) на 90 определений, включающий планшет сорбированный 90 моно аллергенами, набор калибраторов, включающий контроли.
- Номер по каталогу: 13046B** Полный набор (Восточная комбинированная панель) на 90 определений, включающий планшет сорбированный 90 моно аллергенами, набор калибраторов, включающий контроли.
- Номер по каталогу: 13047C** Полный набор (Вегетарианская комбинированная панель) на 90 определений, включающий планшет сорбированный 90 моно аллергенами, набор калибраторов, включающий контроли.

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 (иммуноферментный анализ). Микропланшеты сорбированы различными аллергенами, каждый аллерген в отдельной ячейке. Разбавленная человеческая сыворотка инкубируется в лунках стрипов с иммобилизованными антигенами (аллергенами). Специфические IgG4-антитела связываются с соответствующим аллергеном. Неспецифические антитела удаляются при промывке. Аллерген-специфические антитела распознаются добавляемыми в систему вторыми антителами к IgG4 человека, конъюгированными с пероксидазой. Инкубация с раствором субстрата ТМБ (тетраметилбензидин) приводит к развитию синей окраски. После остановки реакции (при добавлении раствора H₃PO₄) цвет раствора меняется с синего на желтый. Оптическая плотность образцов измеряется спектрофотометрически на длине волны 450 нм (референсфильтр 620 нм). Концентрация аллерген-специфических IgG4-антител пропорциональна интенсивности окрашивания.

РЕАГЕНТЫ

НАБОРА РЕАГЕНТОВ на 90 опр.	№ 13045-А	№ 13046-В	№ 13047-С
Анти-IgG4-ферментный конъюгат	1 флакон по 11 мл	1 флакон по 11 мл	1 флакон по 11 мл
Концентрат промывочного буфера	1 флакон по 30 мл	1 флакон по 30 мл	1 флакон по 30 мл
Раствор субстрата ТМБ	1 флакон по 12 мл	1 флакон по 12 мл	1 флакон по 12 мл
Стоп-раствор (9.5% H ₃ PO ₄)	1 флакон по 6 мл	1 флакон по 6 мл	1 флакон по 6 мл
Буфер для разведения образцов	1 флакон по 11 мл	1 флакон по 11 мл	1 флакон по 11 мл
Калибраторы (стандарты)	4 флакона по 0.5 мл	4 флакона по 0.5 мл	4 флакона по 0.5 мл
Положительный контроль	1 флакон по 0.5 мл	1 флакон по 0.5 мл	1 флакон по 0.5 мл
Отрицательный контроль	1 флакон по 0.5 мл	1 флакон по 0.5 мл	1 флакон по 0.5 мл
Сорбированный аллергенами планшет	1 планшет	1 планшет	1 планшет

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 определения аллерген-специфических IgG4-антител используется сыворотка или плазма пациента. Никакие добавки или консерванты не нужны для поддержания целостности образца. Закрытые образцы, хранящиеся при 2-8°C, должны быть проанализированы в течение 48 часов после забора крови. Если анализ не может быть проведен в течение этого времени, образец следует перенести в герметично закрывающую пробирку и заморозить. Как и с большинством биологических материалов, следует избегать повторных циклов замораживания-оттаивания образца. Использование гемолизированных или липемичных образцов не рекомендуется. Перед началом анализа образец должен достичь комнатной температуры, затем его следует перемешать осторожным переворачиванием пробирки перед процедурой **разведения 1:100 раз** (например, 100 мкл образца + 9,9 мл Буфера для разведения образцов). Важно: при измерении используя программу «Allerg-O-Screening» разбавляющий фактор не вносить.

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 готовы к использованию

ТМБ субстрат готов к использованию

Стоп-раствор готов к использованию

Промывочный раствор: в градуированный цилиндр налить 30 мл концентрированного буфера для промывки и развести дистиллированной водой. Перелить раствор в емкость для хранения. Рабочий Промывочный раствор стабилен при хранении в течение одной недели при комнатной температуре.

ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Вносить компоненты согласно схеме анализа.
2. **Разведите образцы пациентов 1:100** буфером для разведения (100 мкл образцов + 9.9 мл буфера для разведения образцов. **Контроли и калибраторы готовы для использования и не требуют разведения.**
3. Внести по 100 мкл стандартов и по 100 мкл разведенных контролей и анализируемых образцов пациентов в соответствующие ячейки планшетов (в соответствии со схемой планшета).
4. Накрыть планшет для предотвращения испарения. Инкубировать 1 час при 37°C.
5. После инкубирования провести аспирацию растворов из всех ячеек и трижды промыть все стрипы, используя 500 мкл промывочного раствора на каждую ячейку. Процедуру промывания можно проводить вручную или применяя промывочное устройство. Удалить остатки жидкости, промокнув планшеты салфеткой.
6. Внести по 100 мкл конъюгата в каждую ячейку. Накрыть стрипы и инкубировать 1 час при 37°C.
7. Промыть ячейки, как описано в шаге 5.
8. Внести по 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую ячейку и накрыть стрипы фольгой и инкубировать 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. Через 5 минут измерьте оптическую плотность растворов на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм (референсная длина волны 620 нм).

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рекомендуется использование программного обеспечения или компьютерной программы «Allerg-OScreening». При ручных расчетах для получения стандартной кривой следует по референсным точкам построить калибровочный график на полулогарифмической бумаге (по оси абсцисс - \log концентрации IgG4 нг/мл; по оси ординат - оптическая плотность на длине волны 450 нм). Определить значения концентраций специфических IgG4 в анализируемых образцах в диапазоне непосредственно из калибровочной кривой. Полученные значения концентрации контролей должны соответствовать значениям, указанным в сертификате качества, который вкладывается в набор.

Внимание: Необходимо умножить значения для контролей и образцов на 20

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЕНИЙ

Набор определяет концентрацию IgG4 в диапазоне от 100 до 2500 нг/мл

ЛИНЕЙНОСТЬ

Анализ четырех случайным образом отобранных образцов сыворотки показал линейность методики ($< \pm 20\%$) для 3 последовательных разведений. Из-за гетерогенности образцов человеческой сыворотки или плазмы нельзя исключить разнящиеся результаты.

образцы сыворотки 0.1 мл + 9.9 мл буфера для разбавления (для каждого планшета)

100 мкл неразбавленных калибраторов / контролей 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



ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

РЕКОМЕНДАЦИИ

IgG4 < 100 нг/мл - **Пищу можно употреблять без ограничений.** Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

> 100 IgG4 < 250 нг/мл - **Один или два раза в неделю можно употреблять эту пищу, соблюдая ротацию.** Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

IgG4 > 250 нг/мл - **Избегайте употребления в пищу данного продукта по крайней мере 3 месяца.** Уделяйте внимание возможным результатам IgE.

1 нг/мл ≈ 1 нг/мл

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

ТОЧНОСТЬ

Вариабельность и воспроизводимость результатов. Воспроизводимость внутри одной серии

Образец	Среднее значение [МЕ/мл]	Кoeffициент вариации, %
1 (n=3)	>100	<11
2 (n=3)	>250	<21

ЛИТЕРАТУРА

- 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.
- 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.
- 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.
- Zar S, Mincher L, Benson MJ, Kumar D: Food-specific IgG4 antibody-guided exclusion diet improves symptoms and rectal compliance in irritable bowel syndrome. Scand J Gastroenterol 2005, 40:800-807.
- 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.
- 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. Согласно статье 1 параграфа 2b Директивы ЕС 98/79/ЕС использование медицинского оборудования для диагностики in-vitro предназначено для обеспечения производителем гарантии пригодности, надлежащих эксплуатационных показателей и безопасности продукта. Поэтому необходимо строго соблюдать указанную в инструкции по применению методику проведения анализа, а также принять к сведению изложенные данные, предупреждения и предостережения. Набор может применяться исключительно в соответствии с изложенным на стр. 1 (п. «Назначение»).

2. Определение необходимо проводить в соответствии с данной инструкцией (которая содержит всю необходимую информацию, в т.ч. и предупреждающего, и предостерегающего характера). Использование тестового набора совместно с анализаторами и подобным оборудованием необходимо валидировать. Любые изменения дизайна, композиции методики определения, а также использование в сочетании с какими-либо иными не санкционированными производителем продуктами не являются правомочными; при подобных изменениях, приводящих к неверным результатам анализа и иным происшествиям, пользователь несет личную ответственность. Производитель не несет ответственности за любые результаты, которые получены методом визуальной оценки образцов для анализа.

3. Набор предназначен для применения обученным и квалифицированным персоналом для решения исключительно исследовательских или диагностических задач. Анализ не может проводиться беременными женщинами.

4. Лабораторное оборудование необходимо содержать в соответствии с инструкциями производителя, а также проводить проверку корректного функционирования перед его использованием.

5. Исключительно для диагностики in-vitro. Допускается лишь однократное использование. Не применять компоненты с истекшим сроком годности. Не использовать совместно с данным набором реагенты иных производителей или компоненты наборов из разных партий (за исключением случаев, оговоренных на стр. 2).

6. Не использовать компоненты набора при нарушении целостности их упаковки. Перед применением провести проверку всех растворов на микробиологическое загрязнение. В целях исключения испарения и микробиологического загрязнения необходимо сразу после использования плотно закрывать все флаконы. Не обменивать завинчивающиеся крышки на флаконах с реагентами.

7. Набор аттестован к применению при температурах, которые указаны в схеме проведения анализа (см. стр.

4). Выполнения анализа при более высоких или низких температурах может привести к получению значений, которые не укладываются в диапазон приемлемой точности.

8. Промывание является крайне важной процедурой. Ненадлежащее проведение данной процедуры приведет к искажению результатов анализа. Рекомендуется применять многоканальные пипетки и автоматические устройства для промывания микропланшет.

9. Для исключения перекрёстной контаминации и получения ложно-положительных результатов настоятельно рекомендуется все операции с пипетками осуществлять должным образом. Следует применять только чистые наконечники, дозаторы и лабораторную посуду.

10. Компоненты на основе человеческой сыворотки проверялись с использованием методик, соответствующих стандартам ЕС на присутствие антител к HIV1 / HIV2, анти-НВс, анти-НСV, а также к антигену гепатита HBsAg – результаты были найдены отрицательными. Тем не менее, с материалами на основе человеческой сыворотки необходимо обращаться как с потенциально инфекционными (Биологическая Опасность).

11. Некоторые компоненты набора могут содержать бычий сывороточный альбумин с отсутствующим, согласно данным производителя, инфекционным потенциалом. Из-за возможности присутствия необнаруживаемых инфекционных агентов со всеми продуктами животного происхождения рекомендуется обращение как с потенциально инфекционными.

12. Необходимо соблюдать следующие правила безопасности при работе со всеми реагентами: - не заносить в глаза, на кожу или на одежду (P262). Не вдыхать аэрозоль (P260). Ни в коем случае не работать с пипетками ртом, а с применением надлежащих приспособлений. - ПРИ ПРОГЛАТЫВАНИИ: прополоскать рот. Рвоту НЕ вызывать (P301/330/331). - ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (волосы): сразу же снять / удалить всю загрязненную одежду. Загрязненный участок промыть водой / под душем (P303/361/353). - ПРИ ВДЫХАНИИ: вывести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить покой в положении, удобном для дыхания (P303/340). - ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: в течение нескольких минут осторожно промыть водой. При возможности снять контактные линзы (если таковые присутствуют). Промыть еще. (P305/351/338) - при проведении анализа не принимать пищу, напитки и не курить. Хранить вдали от пищевых / кормовых продуктов и напитков. - использовать защитные перчатки / защитную спецодежду / средства защиты глаз (P280). После работ с компонентами набора тщательно вымыть руки (P264) и обеспечить уход за кожей.

- паспорт безопасности предоставляется по запросу.

13. Раствор стоп-реагента вызывает сильный ожог кожи и поражение глаз (H314).

14. Возможна потенциальная мутагенная активность раствора ТМБ в высоких концентрациях. Ввиду низкой концентрации ТМБ в растворе субстрата его мутагенное действие при надлежащем использовании можно исключить.

15. Консервирующие агенты (Bronidox, Thimerosal, Azid) обладают токсичным действием на водные организмы, но в таких концентрациях уже не представляют опасности для окружающей среды. При утилизации больших количеств реагентов необходимо их смывание обильным количеством воды. Thimerosal (буферный раствор В для промывки) при длительном или регулярном воздействии может обладать поражающим органы действием (H373).

16. Отходы, содержащие сыворотку, необходимо собирать в отдельные ёмкости, которые содержат соответствующий дезинфицирующий агент в достаточных концентрациях. Обращение с данным материалом должно соответствовать государственным нормам и регламентам по безопасности при работе с биологически опасным материалом.

17. Что касается тестовых наборов для диагностики in-vitro, компания ссылается на государственные нормы в отношении медицинского оборудования.

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