



**Návod k použití**

## **Specific IgE RIA (RAST)**

### **Radioimunoanalýza**

pro semikvantitativní detekci specifických IgE protilátek proti alergenům  
v lidském séru nebo plazmě

Doba inkubace: 20 (7) hodin

Kat. č.: **ILR-E01**

Skladování: +2 °C až +8 °C

Pouze pro diagnostické použití in-vitro

Září 2007

**IMMUNOLAB GmbH, Otto-Hahn-Str. 16, D-34123 Kassel**

Tel: +561 491742-0, Fax: +561 491742-20, e-mail: [info@immunolab.de](mailto:info@immunolab.de)

**OBSAH**

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Princip testu .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Složení soupravy .....</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Materiál potřebný k provedení testu.....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Odběr a skladování vzorků .....</b>	<b>6</b>
<b>7</b>	<b>Příprava pracovních roztoků.....</b>	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>Pracovní postup .....</b>	<b>7</b>
<b>9</b>	<b>Výpočet hodnot .....</b>	<b>8</b>
<b>10</b>	<b>Kontrola jakosti.....</b>	<b>9</b>
<b>11</b>	<b>Očekávané výsledky .....</b>	<b>9</b>
<b>12</b>	<b>Limity testu .....</b>	<b>9</b>
<b>13</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>10</b>

## 1 Úvod

IgE protilátky jsou unikátní imunoglobuliny zodpovědné za vyvolání alergické reakce. Jejich existence je známa již přes dvacet let. Mechanismy působení zahrnují počáteční antigenní stimulaci imunokompetentních B lymfocytů specifickým antigenem. Je to proces, který u lymfocytů vyvolává tvorbu specifických protilátek různých tříd. IgE protilátky se prostřednictvím svého Fc fragmentu částečně vážou na povrch mastocytů a bazofilních leukocytů. Při další stimulaci specifickými alergeny se navázané IgE molekuly váží prostřednictvím svého Fab fragmentu na alergeny. Tato kombinace přiměje mastocyty a bazofilní leukocyty k vypuštění vazoaktivních aminů do krve a okolní tkáně. Tyto látky vyvolávají stažení hladkého svalstva a nakonec vedou k alergickým stavům, jako jsou otoky a zarudnutí kůže, kopřivka, dermatitida, rýma, senná rýma, astma a anafylaktický šok.

Stanovení IgE má velký přínos v diagnostickém posouzení pacientů s prokázaným nebo domnělým alergickým onemocněním. V normálních případech souvisejí hodnoty IgE s věkem, přičemž obvyklé hodnoty jsou nejvyšší ve věku okolo 10 až 14 let. U kojenců a dětí s atopickou alergií v rodinné anamnéze hrozí vyšší riziko rozvinutí onemocnění a představují skupiny obyvatel, která by měla být sledována. Studie ukázaly, že stavy jako astma, rýma, ekzém, kopřivka, dermatitida a některé parazitické infekce, vedou ke zvýšené hladině IgE. U pacientů se sennou rýmou a atopickým ekzémem může být hladina třikrát až desetkrát vyšší než u normálních pacientů.

Cirkulující hladiny alergen-specifického IgE je možné určit pomocí specifických alergenů připojených na pevnou fázi testu. Postup známý jako test RAST (radioallergosorbent test) využívá protilátku označenou radioaktivním izotopem.

## 2 Princip testu

Radioimunoanalýza specifických IgE protilátek se provádí následujícím postupem. Alergenový disk se tři hodiny inkubuje se vzorkem (sérum pacienta) obsahujícím předpokládané alergen-specifické IgE. Disk se omyje a 16 až 24 hodin se inkubuje s protilátkou proti IgE označenou radioaktivním izotopem ( $^{125}\text{I}$ ). Následuje další omytí disku. V pevné fázi zůstává navázaný jód  $^{125}\text{I}$  v množství úměrném množství alergen-specifického IgE ve vzorku pacienta. Koncentrace alergen-specifického IgE je přímo úměrná naměřenému počtu impulsů za minutu.

## 3 Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny

- Pouze pro použití in vitro! Nepožívejte ani nepolykejte! Je nutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce, zákaz jídla, pití a kouření v laboratoři.
- Upozornění: Materiál potenciálně nebezpečný pro životní prostředí.

- Všechny komponenty použité při přípravě reagií na základě lidského séra byly testovány schválenou metodou na přítomnost protilátky na lidský T-lymfotropický virus typu III / lymfadenopatii spojenou s virem (HTLV III / LAV) i na povrchový antigen hepatitidy B (HBsAg) s negativním výsledkem (nebyly opakovaně reaktivní).
- Vzhledem k tomu, že žádná metoda testování nemůže se stoprocentní jistotou vyloučit přítomnost HTLV III / LAV, HBsAg nebo jiných infekčních látek, mělo by se s materiálem na bázi lidského séra zacházet podle instrukcí o biologické bezpečnosti 2. stupně tak, jak se doporučuje u potenciálně infekčního lidského séra nebo krve.
- Některé reagenty obsahují toxickou složku azid sodný. Vyvarujte se kontaktu s kůží.
- Upozornění: Obsahuje azid sodný, který může reagovat s měděným potrubím a vytvářet potenciálně explozivní azidy kovů. Při likvidaci pročistěte velkým množstvím vody, abyste zabránili vzniku azidu.

## 4 Složení soupravy

### Skladování a stabilita

Součásti soupravy uchovávejte při teplotě +2 °C až +8 °C. Všechny reagenty spotřebujte do data spotřeby uvedeném na etiketě.

#### 4.1 Reagenty

Tracer	1 × 5,2 ml
Promývací roztok (50× konc.)	4 × 10 ml

#### Tracer

5,2 ml kozí IgE konjugovanou s jódem 125 v proteinovém pufru, konzervovaný 0,05% azidem sodným

#### Promývací roztok

50krát koncentrovaný roztok PBS s detergenty.

#### 4.2 Referenční komponenty

Nejsou součástí této soupravy, je nutné je objednat samostatně.

#### Referenční disky

Ampule obsahující 40 disků v konzervačním roztoku.

#### Referenční sérum A, B, C, D

Séra připravená pro sestavení kalibračních dat.

- Referenční sérum A: 0,55 ml lidského séra s vysokým obsahem specifických IgE proti referenčnímu alergenu (timothy).
- Referenční sérum B, C a D: 0,55 ml jednotlivých ředění Referenčního séra A doplněná do celkového objemu koňským sérem neobsahujícím specifické IgE protilátky.

### 4.3 Alergenní disky

Nejsou součástí této soupravy, je nutné je objednat samostatně.

Každé balení obsahuje 25 disků s navázanými specifickými antigeny v konzervačním roztoku. Nabízené disky zahrnují specifické alergeny z následujících skupin obvyklých alergenů: trávy, plevele, epitélie, plísňe, potraviny, prach, roztoči, chemické látky a léky.

## 5 Materiál potřebný k provedení testu

### 5.1 Přístrojové vybavení

Správné provedení RAST testu na stanovení specifických IgE protilátek vyžaduje použití gamma počítadla.

### 5.2 Komponenty pro provedení testu

Všechny komponenty potřebné k provedení testu jsou popsány v tabulce (Tabulka 1).

**Tabulka 1 Komponenty k provedení testu**

Komponenty k provedení testu		Balení	Objem
Reagencie	Tracer	1 ampule	5,2 ml
	Promývací roztok (konc.)	4 lahvičky	4 × 10 ml
Referenční komponenty	Referenční disky	1 ampule	40 disků
	Referenční séra	4 ampule	4 × 0,55 ml
Alergenní disky	Disky se specifickým antigenem	25 disků v balení	

### 5.3 Další potřebné vybavení k provedení testu

Stojan na testovací zkumavky

Jedno a vícekanálové pipety různých objemů

Špičky pro jednorázové použití

Třepačka Vortex

Gamma počítadlo

Odměrný válec, objem 1000 ml

Polystyrenové testovací zkumavky, 12 mm × 75 mm

Plastová fólie

Aspirátor

Pinzeta

Vodní lázeň, 37 °C

## 6 Odběr a skladování vzorků

- Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum. Chylózní, hemolytické nebo bakteriálně kontaminované vzorky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky.
- Netraumatickým napíchnutím žíly sterilní injekční stříkačkou nebo vakuovou zkumavkou proveďte flebotomii. Pokud používáte injekční stříkačku, odstraňte jehlu a opatrně přelijte krev do zkumavky. Nechte krev srážet alespoň po dobu 20 až 30 minut, dokud se nezačne sraženina vtahovat. Před centrifugací odběrnou zkumavku jemně uzavřete dřevěným aplikátorem.
- Ihned po centrifugaci přesuňte odseparované sérum do zkumavky a pevně ji uzavřete. Skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C nebo v případě, že rozbor nebude prováděn ve stejný den, zmrazte. Vzorky by se neměly opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.
- Stejně jako u všech vzorků, které mohou obsahovat patogeny, dbejte na to, aby nedošlo ke kontaktu s otevřenými ranami.
- K udržení integrity vzorku nejsou potřeba žádná aditiva nebo konzervanty.

## 7 Příprava pracovních roztoků

### Promývací roztok

Do odměrného válce (objem min. 1000 ml) přidejte 10 ml koncentrovaného promývacího roztoku. Doplněte destilovanou vodou do celkového objemu 500 ml.

Přelijte obsah válce do láhve na uskladnění. Množství vystačí pro 30 zkumavek.

Pro každý rozbor je nutné připravit čerstvý promývací roztok. Promývací roztok je při pokojové teplotě stabilní po dobu 48 hodin.

## 8 Pracovní postup

Všechny reagensy a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu a před použitím je jemně promýchejte.

Při každém testu by měla být sestrojena kalibrační křivka.

1. Připravte si zkumavky a následně je označte:

- Zkumavka číslo 1 slouží pro stanovení celkového součtu.
- Zkumavky číslo 2 až 8 jsou referenční (duplikáty referenčních sér A, B, C, D) pro kalibraci dat, zkumavka číslo 9 je kontrola.
- Ostatní zkumavky slouží pro stanovení alergenu, který má být u pacienta testován.

### Poznámka:

Všechny disky by se před vložením do zkumavky měly osušit na filtračním papíře, aby se odstranil přebytečný pufr v kterém jsou skladovány. Se všemi disky manipulujte použitím pinzety.

2. Pinzetou vložte referenční disk na dno každé referenční zkumavky (zkumavka 2 až 9).
3. Disk se specifickým alergenem vložte na dno zkumavky pro stanovení specifického alergenu u pacienta. Disk nepřidávejte do zkumavky určené ke stanovení celkového součtu.
4. Pipetujte 50 $\mu$ l referenčního séra A až D přímo na referenční disky v příslušných zkumavkách (2 až 8).
5. Pipetujete 50 $\mu$ l kontrolního vzorku nebo vzorku pacienta přímo na disky v příslušných zkumavkách.
6. Zkumavky překryjte plastovou fólií a nechce je při pokojové teplotě (+20 °C až +25 °C) inkubovat po dobu 3 hodin.
7. Pipetujte 2 ml čerstvě připraveného promývacího roztoku do každé zkumavky kromě zkumavky s celkovým součtem. Nechte 10 minut stát. Důkladně odsajte promývací roztok. Čisticí proceduru opakujte ještě dvakrát, celkem tedy třikrát. Po posledním odsátí nechte zkumavky na minutu stát. Pro odstranění zbytků

promývacího roztoku znovu odsávejte. Na každý rozbor je nutné připravit čerstvý promývací roztok. Pracovní promývací roztok je při pokojové teplotě stabilní po dobu 48 hodin.

8. Pipetujte 50 $\mu$ l Traceru I125 přímo na disk v každé zkumavce. Tracer nepřidávejte do zkumavky pro celkový součet. Zkumavky překryjte plastovou fólií, abyste zabránili vypařování, a nechte při pokojové teplotě (20 °C až +25 °C) působit přes noc (20 hodin) nebo při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin.
9. Třikrát promyjte, postupujte jako v bodě 7.
10. Před vložením do gamma počítadla každou zkumavku zvenku otřete a promýchejte použitím vortexu.

## 9 Výpočet hodnot

1. Spočítejte průměrné hodnoty referenčních vzorků (referenční séra A, B, C, D).
2. Spočítejte hodnotu doplňkového referenčního bodu E. Hodnotu získáte vydělením průměrně hodnoty referenčního séra D dvěma.
3. Spočítejte hodnoty kontrol a vzorků pacientů na všech discích následujícím způsobem.

Porovnejte hodnoty všech kontrol a vzorků pacientů s hodnotami referenčních sér A, B, C a D a vypočítaným referenčním bodem E. Hodnocení výsledků interpretujte pomocí tabulky (Tabulka 2).

**Tabulka 2 Hodnocení výsledků**

Specifické IgE protilátky		
Třída	Hodnota vzorku	Koncentrace
4	> A	velmi vysoká
3	B až A	vysoká
2	C až B	střední
1	D až C	nízká
1/0	E až D	velmi nízká
0	< E	nedetekovatelná

Alternativně je možné provést semikvantitativní hodnocení připsáním hodnot 17,5, 3,5, 0,7, 0,35 a 0,1 U/ml, v tomto pořadí, k referenčním sérům A, B, C, D a E. Zaneste hodnoty vs. koncentrace referenčních bodů do log-log grafu. Přímo z grafu získáte hodnoty kontrol a pacientů. Hodnoty pod 0,1 U/ml jsou nezjistitelné. Hodnoty se zvyšují s rostoucí koncentrací alergen-specifického IgE.



## 10 Kontrola jakosti

Správná laboratorní praxe vyžaduje, aby byla zkontrolována kvalita vzorků, a zhodnotil se tak výsledek testu. Všechn použitý materiál by se měl opakovaně testovat, aby se stanovily střední hodnoty a přijatelné rozmezí.

## 11 Očekávané výsledky

Určování hladiny alergen-specifických IgE je semikvantitativní měření. Podobné odpovědi mezi různými typy alergenových disků nutně neznamenají podobné koncentrace specifického IgE nebo podobné klinické projevy. Proto nejsou očekávané hladiny pro koncentrace alergen-specifického IgE zcela použitelné.

Obecně lze říci, že čím je hodnocený vzorek spadá do vyšší třídy, tím větší je koncentrace alergen-specifického IgE pro kterýkoli alergenový disk.

Obvykle proběhne několik stanovení v časovém sledu, čímž se sleduje léčba nebo imunitní odpověď pacienta během různých ročních období. Tímto by měl být zajištěn spolehlivý systém kontroly se známými pozitivními a negativními kontrolami, tak aby se tak zajistila kontinuita ohlášených hodnot nebo jejich klasifikace.

## 12 Limity testu

1. Spolehlivé a reprodukovatelné výsledky se získají, pokud je test přesně a pečlivě podle návodu, který je součástí testu a při dodržení správných laboratorních postupů.
2. Klinická diagnóza by neměla být určena pouze na základě poznatků jednoho testu, ale měla by brát v potaz všechny klinické a laboratorní údaje.
3. Určení cirkulujících hladin alergen-specifického IgE je semikvantitativní rozbor. Nemá absolutní normu a je určen jednotkami hodnot nebo klasifikací do tříd.
4. Podobné odpovědi mezi různými typy alergenových disků nebo klasifikací tříd nutně nemusí odpovídat klinickým příznakům.
5. Pokud jsou celkové hodnoty IgE velmi vysoké ( $> 500$  U/ml), měla by se nízká odpověď alergen-specifického IgE interpretovat s opatrností.

### 13 Literatura

1. Ishizaka, K., Ishizaka, T. und Hornbrook, M.M.: Physicochemical Properties of Human Reaginic Antibody IV. Presence of a Unique Immunoglobulin as a Carrier of Reaginic Activity. *J. Imm.* 97, 75 (1966)
2. Hamilton, R.: Radioimmunoassay in the Assessment of Allergic Disease. *Ligand Quarterly* 2, 13 (1979)
3. Johansson, S., Bennich, H. und Berg, T.: The Clinical Significance of IgE. *Progress in Clin. Immunology* 1 (1972)
4. Kjellman, M.: Immunoglobulin E and Atopic Allergy in Childhood. Linköping University Medical Dissertations, Nr. 36 (1976)
5. Wittig, H., Bellott, J., Fillippi, I. und Royal, G.: Age-Related Serum IgE Levels in Health Subjects and in Patients with Allergic Disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 66, 305 (1980)
6. Gleich, G., Averbeck, A. und Swedlund, H.: Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay. *J. Lab. and Clin. Med.* 77, 690 (1971)

Poznámky

## Poznámky

Souprava je distribuována společností TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

V případě dotazů nás kontaktujte.

Tel: +420 541 248 311

Email: [info@testlinecd.cz](mailto:info@testlinecd.cz)