



**Návod k použití**

## **Total IgE ELISA**

### **ELISA test**

pro detekci a kvantifikaci lidských celkových IgE protilátek  
v lidském séru nebo plazmě



Kat. č.: **ILE-IGE02**

Skladování: +4 °C až +8 °C

Pouze pro diagnostické použití in-vitro

Květen 2012

**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>Informace o výrobku .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Princip testu .....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny.....</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Složení soupravy .....</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Další potřebné vybavení k provedení testu .....</b>	<b>7</b>
<b>7</b>	<b>Odběr a skladování vzorků .....</b>	<b>7</b>
<b>8</b>	<b>Pracovní postup .....</b>	<b>7</b>
<b>9</b>	<b>Hodnocení výsledků .....</b>	<b>9</b>
<b>10</b>	<b>Charakteristika soupravy.....</b>	<b>10</b>
<b>11</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>11</b>

## 1 Informace o výrobku

IMMUNOLAB Total IgE je ELISA souprava pro detekci a kvantifikaci celkových IgE protilátek v lidském séru nebo plazmě. K dostání jsou i další varianty testu určené pro jiné tělní tekutiny a lze si je vyžádat u Technického servisu společnosti IMMUNOLAB. Pouze pro diagnostické použití in-vitro.

Sérologický nález je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

## 2 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..

## 3 Princip testu

Souprava IMMUNOLAB Total IgE je založena na principu ELISA. Myší monoklonální protilátka proti lidskému IgE je navázána na povrchu mikrotitračních jamek. Neředěný vzorek pacienta nebo připravené standardy se pipetují do jamek mikrotitrační destičky společně s konjugátem s obsahem protilátek proti lidskému IgE. Na jedné straně vzniká vazba mezi lidskou IgE protilátkou a imobilizovanou protilátkou v jamce mikrotitrační destičky, na druhé straně mezi lidskou IgE protilátkou a protilátkou v konjugátu. Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě je destička promyta zředěným promývacím roztokem, čímž se odstraní nenavázaný materiál. Následně je pipetován substrát (TMB) a inkubuje se 15 minut,

čímž se v jamkách vytvoří modré zbarvení. Vývoj zbarvení se ukončí přidáním zastavovacího roztoku, po němž se barva změní z modré ve žlutou. Výsledné zbarvení se změří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Koncentrace IgE protilátek je přímo úměrná intenzitě zbarvení.

#### 4 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.
- Všechna séra, plazmy a pufry byly testovány všeobecně uznávanými metodami na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV a jsou negativní. Přesto je nutné respektovat preventivní opatření, např. používat latexové rukavice.
- Rozlitý vzorek a reagentie je třeba setřít za použití dezinfekčního roztoku (např. 5% chlornanu sodného) a náležitě zneškodnit.
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagentie vytemperovat na laboratorní teplotu (+18 °C až +25 °C).
- Před pipetováním by se všechny reagentie měly důkladně promíchat šetrným nakláněním nebo kýváním lahvičky. Vyhněte se dynamickému třepání, které vede k tvorbě pěny.
- Je důležité pipetovat reagentie ve stejných intervalech, aby ve všech jamkách mikrotitrační destičky byly zajištěny stejné podmínky testu.
- Při dávkování reagentií z lahviček se ujistěte, že nedošlo ke kontaminaci uzávěru. Vyvarujte se možného vzájemného smíchání reagentií. Obsah lahviček je často citlivý vůči oxidaci, proto se musí otevírat pouze na omezenou dobu.
- Aby nedošlo k přenosu nebo křížové kontaminaci, je nutné používat čisté jednorázové špičky na pipety.
- Všechny reagentie se musí spotřebovat do data jejich expirace.
- V souladu se správnou laboratorní praxí (SLP) a normou ISO 9001 by měly být veškeré používané laboratorní přístroje pravidelně kontrolovány z hlediska jejich přesnosti a spolehlivosti. To se týká především mikrotitračních pipet, promývacích a odečítacích zařízení (ELISA Reader).
- Je nutné zabránit kontaktu některých reagentií, především Zastavovacího roztoku a Substrátu, s kůží, očima a sliznicemi, neboť může dojít k jejich podráždění nebo poleptání a hrozí zde riziko intoxikace.

## 5 Složení soupravy

Mikrotitrační destička potažená myší monoklonální protilátkou	1 × 12 stripů
Kalibrátor (Standard) 0 IU/ml	1 × 1 ml
Kalibrátor (Standard) 5 IU/ml	1 × 200 µl
Kalibrátor (Standard) 25 IU/ml	1 × 200 µl
Kalibrátor (Standard) 100 IU/ml	1 × 200 µl
Kalibrátor (Standard) 250 IU/ml	1 × 200 µl
Kalibrátor (Standard) 100 IU/ml	1 × 200 µl
Konjugát	1 × 22 ml
Substrátový roztok (TMB)	1 × 12 ml
Zastavovací roztok	1 × 12 ml
Promývací roztok (10krát koncentrovaný roztok)	1 × 60 ml
Plastové fólie	2 ks
Plastový sáček	1 ks
Pracovní návod	1 ks

### Skladování a stabilita (viz data expirace na štítku krabičky)

Součásti soupravy uchovávejte při teplotě +2 °C až +8 °C. Všechny reagensie a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu (+18 °C až +25 °C). Po použití je nutné destičku opět zabalit, uzávěry lahvíček těsně uzavřít a soupravu uchovávat při teplotě +2 °C až +8 °C. Po otevření je možno soupravu používat tři měsíce.

### Mikrotitrační destička

12 stripů, každý s 8 odlamovacími jamkami potaženými myší monoklonální protilátkou proti lidskému IgE. Připravené k použití.

### Kalibrátor (Standard) 0 IU/ml

1 ml, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

### Kalibrátor (Standard) 5 IU/ml

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Kalibrátor (Standard) 25 IU/ml**

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Kalibrátor (Standard) 100 IU/ml**

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Kalibrátor (Standard) 250 IU/ml**

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Kalibrátor (Standard) 1000 IU/ml**

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Kalibrátor (Standard) 25 IU/ml**

200 µl, lidské sérum ředěné PBS, kalibrováno podle 2. Mezinárodního Standardu 75/502. Roztok obsahuje 0,1 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

**Konjugát**

22 ml, roztok obsahující kozí imunoglobulin proti lidskému IgE značený křenovou peroxidázou. Roztok v pracovním ředění.

**Substrát (TMB)**

15 ml, Jednosložkový substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin). Roztok v pracovním ředění.

**Zastavovací roztok**

15 ml, 0,5 M roztok kyseliny sírové. Roztok v pracovním ředění.

**Promývací roztok**

60 ml, 10krát koncentrovaný roztok PBS a Tween 20. Pracovní koncentrace: ředte koncentrovaný Promývací roztok v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát zahřejte na 37°C po dobu 15 minut.

**Plastové fólie**

2 kusy na překrytí mikrotitračních stripů během inkubace.

## Plastový sáček

Opakovaně uzavíratelný obal pro skladování nepoužitých stripů mikrotitrační destičky v suchu.

## Pracovní návod

### 6 Další potřebné vybavení k provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety pro přesné dávkování objemu 5  $\mu$ l, 100  $\mu$ l a 500  $\mu$ l

Špičky pro jednorázové použití

Fotometr pro mikrotitrační destičky (450 nm)

Promývací zařízení

Zkumavky pro ředění vzorků

Deionizovaná voda

### 7 Odběr a skladování vzorků

Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum nebo plazma (EDTA, heparin). Chylózní, hemolytické nebo bakteriálně kontaminované vzorky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Sérum se po vysrážení a centrifugaci oddělí od krve, která byla sterilně odebrána ze žíly.

Vzorky séra či plazmy se mohou uchovávat při +4 °C až +8 °C maximálně 48 hodin. Při delším skladování zmrazte na -20 °C. Vzorky by se neměly opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.

K vlastnímu testování se používají neřaděné vzorky.

### 8 Pracovní postup

Pro spolehlivé provedení testu se doporučuje postupovat důsledně podle protokolu. Za veškeré změny a modifikace odpovídá uživatel.

Všechny reagenty a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.

Standardy a vzorky by měly být testovány v duplikátech.

Při každém testu by měla být sestrojena kalibrační křivka.

Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu, hermeticky uzavřete a skladujte při +4 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

## 8.1 Příprava pracovních roztoků

### Promývací roztok

Před použitím se naředí v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát se zahřeje na 37 °C po dobu 15 minut.

## 8.2 Provedení testu

1. Připravte si adekvátní množství jamek mikrotitrační destičky pro standardy vzorky a pro Blank. Standardy a vzorky dávkuje v duplikátech.
  - Nechte jednu jamku prázdnou pro Blank.
  - Pipetujte společně 10 µl Standardů v **pracovním ředění** + 200 µl konjugátu.
  - Pipetujte do jamek společně 10 µl každého z **neředěných** vzorků + 200 µl konjugátu.
2. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
3. Odsajte obsah jamek mikrotitrační destičky a přidejte 300 µl zředěného promývacího roztoku do každé jamky. Tento postup se opakuje celkem třikrát. Na závěr vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
4. Dávkuje do každé jamky 100 µl Substrátu. Tentokrát se pipetuje také do jamky pro Blank.
5. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 15 minut při laboratorní teplotě v temnu (např. v zásuvce).
6. Reakce Substrátu se ukončí přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku do každé jamky. Dávkuje jej také do jamky pro Blank.
7. Po důkladném promíchání a setření dna destičky odečtěte absorbanci při 450 nm (podle uvážení použijte referenční vlnovou délku 620 nm). Vytvořené zbarvení je stabilní nejméně 60 minut.



## 9 Hodnocení výsledků

Průměrná hodnota absorbancí je počítána až po odečtení hodnoty Blanku. Absorbance jednotlivých duplikátů u standardů a vzorků by se neměla lišit více jak 10 %.

**Tabulka 1 Orientační hodnoty absorbancí standardů a kontrol před a po odečtení Blanku**

	Absorbance před odečtem Blanku		Absorbance po odečtu Blanku		Průměrná hodnota Absorbance
Blank	0,015				
Standard 0 IU/ml	0,030	0,036	0,015	0,021	0,018
Standard 5 IU/ml	0,070	0,054	0,055	0,039	0,047
Standard 25 IU/ml	0,162	0,148	0,147	0,133	0,140
Standard 100 IU/ml	0,646	0,604	0,631	0,589	0,610
Standard 250 IU/ml	0,974	1,014	0,959	0,999	0,979
Standard 1000 IU/ml	2,007	1,867	1,992	1,852	1,922

### Poznámka

Výše uvedená tabulka (Tabulka 1) popisuje pouze příklad, který byl dosažen při určité teplotě a podmínkách prostředí. Popsané údaje tedy **nepředstavují referenční hodnoty**, kterých je možné dosáhnout stejným způsobem v jiných laboratořích.

Koncentrace protilátek ve Standardech, které jsou obsaženy v soupravě Total IgE ELISA, jsou definovány a vyjádřeny v mezinárodních jednotkách (IU/ml). Tím je umožněno přesné a reprodukovatelné kvantitativní vyhodnocení. Zároveň jsou pak možné i následné kontroly daného pacienta. Hodnoty koncentrací Standardů v těchto jednotkách jsou uvedeny na štítcích příslušných lahvíček.

Sestrojte kalibrační křivku tak, že na osu X vynesete koncentrace Standardů v IU/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Propojením jednotlivých bodů vytvořte kalibrační křivku. Hladinu protilátek ve vzorcích (IU/ml) stanovte odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky. Také je možné využít automatické počítačové programy pro vyhodnocení.

V každém testování sestavte vždy novou kalibrační křivku.

### 9.1 Interpretace výsledků

Normální hladina celkových IgE protilátek je závislá na věku jedince. Hladiny protilátek jsou popsány v tabulce (Tabulka 2).

**Tabulka 2 Přehled normálních hladin celkových IgE protilátek v závislosti na věku**

Věk	Normální hladina protilátek (IU/ml)
novorozenci	< 1,2
1 až 6 měsíců	< 7,2
7 až 12 měsíců	< 12,7
1 až 5 let	< 60
6 až 9 let	< 155
10 až 15 let	< 199
Dospělý jedinci (šedá zóna)	< 100 (60 až 100)

## 10 Charakteristika soupravy

**Tabulka 3 Charakteristika soupravy**

<b>Total IgE ELISA</b>	
<b>Intra-assay</b>	5,1 %
<b>Inter-assay</b>	4,1 %
<b>Inter-lot</b>	1,3 až 5,9 %
<b>Analytická citlivost</b>	0,8 IU/ml
<b>Výtěžnost</b>	87 až 97 %
<b>Linearita</b>	95 až 126 %
<b>Zkřížená reaktivita</b>	nebyla pozorována zkřížená reaktivita s imunoglobulinem IgG
<b>Interference</b>	nebyly zjištěny interference bilirubinu až do koncentrace 0,3 mg/ml, hemoglobinu až do 8,0 mg/ml a triglyceridů až do 5,0 mg/ml
<b>Klinická specificita</b>	100 %
<b>Klinická senzitivita</b>	100 %

## 11 Literatura

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. 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 Assesment of Allergic Disease. *Ligand Quarterly*, 2: 13 (1979).
3. Johansson S, Bennich H, Berg T. The Clinical Significance of IgE. *Progress in Clin. Immunology*, 1: (1972).
4. Kjellmann M. Immunoglobulin E and Atopic Allergy in Childhood. Linköping University Medical Dissertations, Nr. 36, (1976).
5. Wittig H, Bellott J, Fillippi I, 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, Swedlund H. Measurement of IgE in Normal and Allergic Serum by Radioimmunoassay. *J. Lab. and Clin. Med.*, 77: 690 (1971).

**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)