

Distributore esclusivo

Food IgG (40 Foods) Screen ELISA Kit

Test semi quantitativo per allergia IgG mediata su 40 alimenti

Codice prodotto GD15 (4 test) - Per uso diagnostico in vitro

Revisione del 14/06/2010

1 – Scopo diagnostico

L'anti-FOOD IgG kit è un test rapido ELISA per la determinazione di anticorpi IgG verso antigeni alimentari, nel siero umano, plasma o sangue intero. I risultati devono sempre essere correlati con dei dati clinici del paziente, dato che un aumento del livello di IgG a causa degli alimenti non sempre si manifesta con dei sintomi. Dovrebbe notarsi che i risultati di questo kit non danno informazioni sulle allergie IgE mediate. I componenti del kit sono previsti soltanto per l'uso in vitro.

2 – Spiegazione del test

Molti pazienti manifestano una reazione cronica a specifici antigeni alimentari. Diversamente dalle allergie IgE-mediate, che presentano reazioni immediate, le reazioni mediate IgG possono comparire anche molti giorni dopo. La rimozione controllata degli alimenti che causano il problema, dalla dieta del paziente, può migliorare la condizione dello stesso. Sonnolenza, dermatiti, artriti, aumento di peso e affaticamento, sindrome da intestino irritabile, possono essere dovute a sensibilità verso gli alimenti.

3 – Principio del test

Il kit utilizza una micropietra a 96 pozzetti. Gli antigeni estratti da 40 differenti alimenti sono adesi, sia individualmente che come mix sulla superficie dei pozzetti. I campioni (diluiti 1:400) sono aggiunti a tutti gli antigeni adesi sui pozzetti e incubati per 30 minuti per permettere all'anticorpo dell'alimento specifico di legarsi agli antigeni nei pozzetti della micropietra. Dopo aver lavato via i componenti del siero non legati, viene aggiunto ai pozzetti un anticorpo coniugato anti IgG umano di capra con perossidasi di rafano e questo si lega alla superficie di legame degli anticorpi nella seconda incubazione. Il coniugato non legato viene rimosso dal successivo lavaggio, ed una soluzione contenente 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (TMB) ed un substrato enzimatico viene aggiunta per tracciare lo specifico anticorpo di legame. L'aggiunta della soluzione di stop arresta la reazione e permette di raggiungere l'appropriato pH per ottenere lo sviluppo del colore. La densità ottica degli standards, del controllo positivo e dei campioni sono misurate usando un lettore di micropietre a 450nm.

4 – Materiali inclusi nel kit

- **Micropietra:** 96 pozzetti con adesi i differenti antigeni alimentari, in una sacca con dissecante. Le strips sono in set da 3 e numerate, 1,2,3.
- **Reagente 1: Diluente del Campione** 4 fiale contenenti tampone Tris salino 10mM, a pH 7,2 con agente antimicrobico (blu), 4ml,pronte all'uso.
- **Reagente 2: Tampone di lavaggio concentrato (10X)** : tampone Tris salino 10mM con detergente, a pH 7,2, 100ml
- **Reagente 3: Coniugato:** coniugato anti IgG umano di capra con perossidasi di rafano in soluzione stabilizzante proteica ed agente antimicrobico, 12ml, (rosso) pronto all'uso.
- **Reagente 4: TMB Substrato** – soluzione acquosa di TMB e perossido di idrogeno , 12ml pronto all'uso.
- **Reagente 5: Soluzione di Stop** – acido solforico 0,25M, 12ml, pronto all'uso.
- **Standards:** 0, & 25 U/ml, 10mM tampone Tris salino contenente anticorpi di siero umano IgG,1ml, pronta all'uso.
- **Controllo Positivo** – tampone tris salino contenente anticorpi di siero umano IgG,1ml, pronto all'uso.
- **Istruzioni per l'uso.**

5 – Altre attrezzature richieste

1. Cilindri graduati per la preparazione del tampone di lavaggio – pipette di precisione e puntali per dispensare 25ul, 100ul, 1ml – Lavatore per micropiastre o pipetta multicanale o bottiglia di lavaggio – acqua distillata o deionizzata – carta assorbente – lettore per micropiastre con filtri da 450 e 620nm opzionale – in alternativa può essere usato un sistema automatico.
2. Le strumentazioni, manuali o automatiche, devono seguire i seguenti criteri: imprecisione delle pipette: non più del 3% senza carry over tra i passaggi di dispensazione; i lavatori devono rimuovere il 99% del fluido; gli strumenti automatici devono minimizzare il tempo tra il lavaggio e l'aggiunta del successivo reagente.
- 3.

6 – Precauzioni

6.1 – Precauzioni di sicurezza

1. Tutti i reagenti del kit sono soltanto per uso diagnostico in vitro.
2. Solo personale di laboratorio con esperienza può eseguire questo test. Attenersi scrupolosamente al protocollo.
3. Tutti i materiali di origine umana utilizzati per la preparazione degli Standard e del Controllo Positivo sono stati testati e sono risultati negativi agli anticorpi di HIV, HbsAg e HCV. Nessun metodo, comunque può offrire completa sicurezza contro questi agenti infettivi. Bisogna sempre mantenere le normali procedure cliniche di sicurezza dei laboratori. Gli addetti devono indossare guanti ed abbigliamento protettivo quando maneggiano i sieri del paziente o prodotti a base di siero.
4. I reagenti di questo kit contengono agenti antimicrobici, e la soluzione Substrato-TMB contenente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Risciacquare immediatamente con abbondante acqua in caso di contatto.
5. La Soluzione di Stop contiene acido solforico 0,25M. Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Lavare immediatamente con abbondante quantità di acqua in caso di contatto.
6. Ogni liquido giunto a contatto con materiale potenzialmente infettivo deve essere deposto in un contenitore con un disinfettante. I materiali monouso devono essere smaltiti in accordo con la legislazione vigente.

6.2 – Precauzioni Tecniche

1. La micropietra e le soluzioni non devono essere usate se l'involucro è danneggiato o se i liquidi sono dispersi.
2. Portare tutti i reagenti e la micropietra a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Includere il controllo positivo in ogni esecuzione del test, per monitorare la stabilità dei reagenti e la correttezza di esecuzione.
4. Osservare scrupolosamente i tempi e le temperature di incubazione indicati
5. Se si utilizza un sistema automatico, considerare le quantità di volume richieste per il settaggio dello strumento ed il volume residuo delle pipette automatiche.
6. Assicurarsi che non ci sia contaminazione incrociata tra i pozzetti. Utilizzare pipette e materiale diverso per il coniugato ed il substrato TMB.
7. Evitare che i pozzetti si seccino durante gli steps di incubazione
8. Seguire scrupolosamente la procedura di lavaggio descritta. Un lavaggio insufficiente può determinare elevati valori di background.
9. Evitare il contatto diretto con la luce del sole e l'esposizione a fonti di calore durante tutti i passaggi dell'incubazione.
10. Rimettere i tappi colorati correttamente sulla loro fiala per evitare contaminazioni.
11. E' importante dispensare tutti campioni ed il controllo positivo nei pozzetti senza ritardo. Assicurarsi quindi che tutti i campioni siano pronti alla dispensazione.

7 – Validità e Conservazione

All'arrivo, conservare il kit a 2 – 8°C.

Non usare il kit dopo la data di scadenza. Non congelare nessun componente del kit.

8 – Conservazione dei Campioni

possono essere usati campioni di siero, plasma. o di sangue intero, e devono essere conservati a -20° C in caso di lunghi periodi di tempo . I campioni congelati devono essere miscelati bene dopo lo scongelamento e prima dell'uso. Ripetuti congelamenti /scongelamenti possono ripercuotersi sui risultati. L'aggiunta di agenti preservanti ai campioni di siero può influenzare negativamente i risultati. Se avviene una contaminazione microbiologica sui materiali, questi non devono essere usati. I campioni fortemente emolizzati, itterici o lipemici dovrebbero essere evitati.

9 - Preparazione dei campioni e del tampone di lavaggio

1. Diluire il Tampone di Lavaggio (**Reagente 2**) 1:9 in acqua distillata per avere sufficiente tampone per l'esecuzione del test (e.g. 50ml di tampone lavaggio concentrato in 450ml di acqua distillata).
2. Aggiungere 10ul di siero del paziente ad una delle fiale di Diluente Campione (**Reagente 1**) fornite. In alternativa possono essere usati 20ul di sangue intero.

10 – Procedura di Esecuzione

Da Uno a quattro pazienti possono essere analizzati simultaneamente. La micropiastra contiene strips numerate 1, 2, 3. Le strips devono essere usate nel corretto ordine da sinistra a destra 1 -2 – 3. Un set di strips è usato per ciascun paziente (vedi dopo per la posizione degli antigeni, alcuni pozzetti contengono una mix di alimenti) le strips non usate possono essere conservate nella sacca con il dissecante fino a quando richiesto.

Nota importante: prima di iniziare a dispensare i campioni, assicurarsi che le strip siano correttamente orientate; la parte finale, tagliata, della strip deve essere orientata in alto

1. Dispensare 100ul di ogni calibratore nella strip 1 come segue:
- 2.

pozzetto	Standard U/ml
A	0
B	25

3. Dispensare 100ul di controllo positivo nella strip 1 pozzetto C;
4. Dispensare 100ul di campione diluito dei pazienti nelle:
Strip 1: pozzetti D,E,F,G e H;
Strip 2: pozzetti A,B,C,D,E,F,G, e H;
Strip 3: pozzetti A,B,C,D,E,F,G, e H;
5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo 30 minuti decantare o aspirare il contenuto dei pozzetti e lavare i pozzetti tre volte con un sistema automatico di lavaggio o manualmente (vedere sotto). Un lavaggio accurato è la chiave per un buon risultato. **Evitare che i pozzetti si asciugano.**
Procedura di lavaggio manuale: svuotare i pozzetti per inversione. Usando una pipetta multicanale o una bottiglia di lavaggio riempire i pozzetti col tampone lavaggio. Svuotare per inversione e battere su carta assorbente i pozzetti. Ripetere questi passaggi altre due volte. Battere su carta assorbente prima di procedere. Evitare che i pozzetti si asciugano.
6. Dispensare 100ul di Coniugato (**Reagente 3**) in ogni pozzetto. Incubare i pozzetti per 30 minuti a temperatura ambiente
7. Dopo 30 minuti, scartare il contenuto dei pozzetti e lavare accuratamente quattro volte con il tampone di lavaggio. Assicurarsi che i pozzetti siano vuoti ma non secchi.
8. Usando un dispenser a ripetizione, dispensare rapidamente 100ul di Substrato TMB (**Reagente 4**) in ogni pozzetto ed incubare la piastra per 10 minuti. Osservare attentamente lo sviluppo del colore. Lo sviluppo del colore deve essere omogeneo in tutto il pozzetto. Se alcuni pozzetti mostrano dei rapidi sviluppi di colore in dei punti del pozzetto, ciò può essere dovuto al coniugato enzimatico, che non è stato lavato via completamente. Trattare questo risultato con cautela.
9. Aggiungere 100ul di soluzione di stop (**Reagente 5**) ad ogni pozzetto. Per permettere uguali tempi di reazione, la soluzione di stop dovrebbe essere dispensata nei pozzetti nello stesso ordine di quella del Substrato TMB.
10. Leggere la densità ottica (OD) di ogni pozzetto a 450nm, in un lettore per micropiastre entro 10 minuti. Può essere usato un filtro a 620nm come lunghezza d'onda di riferimento

11 – controllo di qualità

1. I valori di OD attesi e i range accettabili per gli standard ed il controllo positivo sono riportati sul certificato incluso nel kit.
2. Il controllo positivo è inteso per monitorare un eventuale mal funzionamento dei reagenti.
3. Ogni pozzetto positivo allo spettrofotometro, ma senza colore visibile dovrebbe essere pulito nella parte inferiore e riletto. Se si verificano valori di OD sotto lo zero, la lunghezza d'onda usata deve essere verificata, il lettore ricalibrato e la lettura ripetuta.

12 – Interpretazione dei risultati.

Riportare l' OD degli standards contro la loro concentrazione e disegnare una linea retta attraverso i punti. La concentrazione degli anticorpi IgG di ciascun alimento può essere letta da questa curva

Responso	grado	Range (AU/ml) ¹
Normale	N	<8
Borderline	(1+)	8 – 12,5
Debolmente positivo	(2+)	12,5 – 25,0
Positivo	(3+)	> 25

¹ in house units

Questi sono i range basati sugli studi della Genesis Diagnostics. Coloro che usano il kit dovrebbero verificare questi range secondo le procedure del proprio laboratorio nelle loro condizioni.

13 – Limitazioni della procedura

1. I risultati devono essere sempre correlati con le condizioni cliniche del paziente giacché valori elevati di IgG a causa degli alimenti non sempre determinano dei sintomi specifici.
2. I risultati di questo kit non danno informazioni sulle allergie IgE mediate.

14 – Caratteristiche del saggio

Imprecisione < 20%

Per la disposizione degli antigeni sulla piastra vedasi tabella acclusa al kit.

Metodica in breve

- Aggiungere 10ul di campione a un flacone di Diluente (**Reagente 1**)
- Dispensare Standards, controllo positivo, e campioni diluiti nei pozzetti specifici della micropiastra
- Incubare **30** minuti a temperatura ambiente.
- Lavare i pozzetti per tre volte.
- Dispensare 100ul di coniugato (**Reagente 3**) nei pozzetti
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
- Lavare i pozzetti per 4 volte.
- Aggiungere 100ul di TMB (**Reagente 4**) in ogni pozzetto
- Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
- Aggiungere 100ul di Soluzione di Stop (**Reagente 5**) a ogni pozzetto
- Leggere la OD a 450nm (singola lunghezza d'onda) o a 450/620nm (doppia lunghezza d'onda).

La micropiastra contiene 12 strip (4 adese come la strip 1, 4 come la strip 2, 4 come la 3) per ciascun paziente usare un set di 1-2-3. La tabella sottostante mostra la posizione dei differenti antigeni alimentari

Strip 1	
A1	Standard anti-Food IgG 0.0 U/ml
B1	Standard Anti-Food IgG 25.0 U/ml
C1	Controllo Positivo Anti-Food IgG
D1	Mais
E1	Avena
F1	Riso
G1	Segale
H1	Frumento
Strip 2	
A2	Latte Vaccino
B2	Albume
C2	Tuorlo
D2	Merluzzo-Eglefino-Platessa
E2	Granchio-Aragosta-Gambero
F2	Soya
G2	Fagiolo-Fagiolo Bianco--Pisello
H2	Cavolo-Broccoli-Cavolfiore
Strip 3	
A3	Patata
B3	Mela+Pera
C3	Lampone-Fragola-Mora
D3	Arancio-Limone-Pompelmo
E3	Mandorla-Anacardo-Nocciola-Pinolo
F3	Lievito+Lievito di birra
G3	Pollo+tacchino
H3	Maiale+ Manzo

G · E · N · E · S · I · S
Diagnostics

distributore esclusivo per l'Italia

BETA DIAGNOSTICI S.A.S.

V.le Europa, 22 is. 57

98124 MESSINA

Tel. 090-696001

Fax. 090-695563

e-mail: info@betadiagnostici.it

web: www.betadiagnostici.it