

Mediterranean Food IgG (109 food) ELISA Kit
Saggio semi-quantitativo per la scoperta della sensibilità alimentare IgG mediata
Codice prodotto GD14M - Per uso diagnostico in vitro -1 test

140906

Uso

Il FOOD IgG kit è un test rapido ELISA per la misura di anticorpi IgG in 109 differenti antigeni di cibo, nel siero umano o plasma. I componenti del kit sono solamente per uso in vitro

Spiegazione del test

Molte persone manifestano una reazione alimentare a specifici antigeni di alimenti. Diversamente gli effetti immediati di allergie IgE-mediate, le reazioni alle IgG mediate possono apparire molti giorni dopo. La rimozione controllata degli alimenti responsabili dalla dieta, in molti casi, migliora la condizione del paziente. Sonnolenza generale, dermatiti, artriti e affaticamento sono associati alle allergie alimentari. Sindrome di intestino irritato può anche essere dovuta alla sensibilità di cibo.

Principio del test

I campioni di siero diluito sono incubati con estrazione dell'antigene da 109 alimenti adesi sui pozzetti della micropietra. Dopo aver lavato via i componenti del siero non legati, viene aggiunto ai pozzetti coniugato anti-umano IgG di capra con perossidasi di rafano tedesco e questo si lega alla superficie di legame degli anticorpi nella seconda incubazione. Il coniugato non legato è rimosso con il lavaggio, e una soluzione contenente 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) ed un enzima substrato è aggiunta per tracciare lo specifico anticorpo legante. L'aggiunta della soluzione stoppante termina la reazione e permette di raggiungere un appropriato pH. per lo sviluppo del colore. La densità ottica degli standards, controllo positivo e campione viene misurata utilizzando un lettore per micropietre a 450nm. La densità ottica è direttamente proporzionale all'attività dell'anticorpo nel campione.

Materiali del kit

Componente	Product Code
	GD14M
Micropietra	1
Diluente del campione	1x10ml
Tampone di lavaggio	1x100ml
Enzima coniugato	1x12ml
Substrato TMB	1x12ml
Soluzione di Stop	1x12ml
Standards	1x1ml
Controllo positivo	1x1ml

- **Micropietra:** 96 pozzetti con adesi 109 antigeni di alimenti in una sacca ermetica con dissecante.
- **Reagente 1: diluente del campione** Tampone Tris-salino 10mM, pH 7.2 con agente antimicrobico, pronto all'uso (blu)
- **Reagente 2: Tampone di lavaggio:** Tampone Tris Salino 100mM con detergente pH 7.2, concentrato (X 10)
- **Reagente 3: Coniugato:** coniugato di IgG anti-umano di capra con perossidasi di rafano tedesco in soluzione stabilizzante proteica e agente antimicrobico, (rosso) pronto all'uso)
- **Reagente 4: Substrato TMB** soluzione acquosa di TMB e perossido di idrogeno, pronto all'uso
- **Reagente 5: Stop Soluzione** acido solforico 0.25M, pronto all'uso.
- **Standards:** 0, & 25 U/ml, 10mM tampone Tris salino contenente anticorpi di siero umano IgG pronta all'uso
- **Controllo Positivo:** Tampone Tris salino 10mM contenente anticorpi di siero umano IgG, pronto all'uso.
- **Istruzioni per l'uso.**

Altri materiali richiesti

1. Provette per la diluizione – cilindri graduati per la preparazione del tampone di lavaggio – pipette di precisione da 25µl, 100µl, 1ml – Lavatore per micropietre o pipetta multicanale o bottiglia di lavaggio – acqua distillata o deionizzata – carta

assorbente – Lettore per micropietre con filtro da 450 e opzionale da 620nm – In alternativa può essere usato un sistema automatico

2. La strumentazione, se manuale o automatica, dovrebbe seguire i seguenti criteri: imprecisione delle pipette non più del 3% senza trasporto tra i passaggi di pipettamento, i lavatori di micropietra dovrebbero rimuovere il 99% del fluido, le macchine automatiche dovrebbero minimizzare il tempo tra il lavaggio e l'aggiunta del prossimo reagente.

Precauzioni di sicurezza

1. Tutti i reagenti del kit sono per uso 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 umani utilizzati per la preparazione degli Standard e del controllo positivo sono stati testati e sono risultati negativi agli anticorpi di HIV, HbsAg e HCV. Il metodo, comunque non può offrire completa sicurezza che questi agenti infettivi siano assenti. 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 ed la soluzione Substrato TMB contiene 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina. Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Sciacquare immediatamente con abbondante acqua in caso di contatto.
5. La soluzione stop contiene acido solforico 0,25 M. Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi. Sciacquare immediatamente con abbondante acqua in caso di contatto.
6. Ogni liquido che è stato messo in 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.

Precauzioni tecniche

1. La micropietra e le soluzioni non dovrebbero essere usate se l'involucro è danneggiato o i liquidi sono dispersi.
2. Portare tutti i reagenti e la piastra a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Includere il controllo positivo in ogni test corsa per monitorare la stabilità del reagente e il corretto svolgimento del esame.
4. Osservare scrupolosamente i tempi di incubazione e le temperature indicate.
5. Se si utilizza un sistema automatico, considerare le quantità di volume richieste per il settaggio dello strumento e il volume inerte delle pipette automatiche.
6. Assicurarsi che non ci sia passaggio di contaminazione tra i pozzetti. Utilizzare pipette e materiale diverso per il coniugato ed il substrato TMB.
7. Non permettere ai pozzetti di asciugarsi durante le varie fasi.
8. Seguire scrupolosamente la procedura di lavaggio descritta. Insufficiente lavaggio può causare alti 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 codificati colorati sulla loro corretta fiala per evitare contaminazioni.
11. E' importante dispensare tutti campioni ed il controllo positivo nei pozzetti senza ritardo. Perciò assicurarsi che tutti i campioni siano pronti alla dispensazione.

Validità e conservazione

All'arrivo, conservare il kit a 2 – 8°C. Dopo l'apertura, il kit è stabile per 3 mesi (o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se minore di tre mesi). Non usare il kit dopo la data di scadenza. Non congelare alcun componente del kit. La soluzione di lavaggio diluita ha una durata di 3 mesi se conservata e chiusa in un flacone a 2 – 8°C.

Conservazione dei campioni

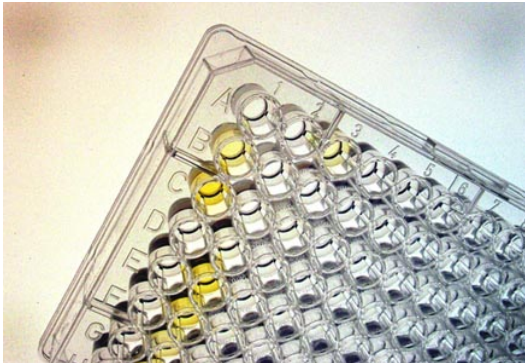
Il siero, plasma, o il sangue intero, possono essere usati e possono essere conservati per lungo tempo a -20° C. I campioni congelati devono essere ben miscelati dopo lo scongelamento e prima del test. Ripetuti congelamenti /scongelamenti possono ripercuotersi sui risultati. L'aggiunta di preservante ai campioni di siero può influenzare negativamente i risultati. Campioni contaminati microbiologicamente, trattati col calore, o contenenti particolato non dovrebbero essere usati. I campioni fortemente emolizzati, itterici o lipemici dovrebbero essere evitati.

Preparazione dei campioni e del tampone di lavaggio

1. Diluire il Tampone di Lavaggio (**Reagente 2**) 1:9 in acqua distillata (50mls di tampone e 450 mls di acqua distillata)
2. Aggiungere 25µl di siero o plasma a una fiala di Diluente del campione (**reagente 1**) e miscelarlo bene.

Procedura

1. Assicurarsi che la micropiastra sia correttamente orientata così come mostrato.



2. Dispensare 100 µl di ogni standard e controllo positivo nei pozzetti così come segue:

Pozzetto	Standard/Controllo
A1	0 U/ml Standard
B1	25 U/ml Standard
C1	Controllo Positivo

3. Dispensare 100 µl di campione paziente diluito nei pozzetti D1-H12.
4. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
5. Dopo 30 minuti versare o aspirare il contenuto dei pozzetti e lavare per tre volte usando un lavatore automatico o il lavaggio manuale secondo la procedura in seguito descritta. Un accurato lavaggio è la chiave per dei buoni risultati. **Non permettere che i pozzetti si asciughino.**
Procedura di lavaggio manuale:
Svuotare i pozzetti per inversione. Usando una pipetta multicanale o il flacone di lavaggio, riempire fino all'orlo i pozzetti con il tampone di lavaggio. Svuotare i pozzetti su carta assorbente. Ripetere l'operazione per altre due volte. Evitare che i pozzetti si asciughino.
6. Dispensare 100µl di Coniugato (**reagente 3**) in ogni pozzetto. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Dopo 30 minuti svuotare il contenuto dei pozzetti e lavare accuratamente i pozzetti con tampone di lavaggio per 4 volte. Evitare che i pozzetti si asciughino.
8. Usando un dispensare rapidamente 100µl di Substrato TMB (**Reagent 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 dei pozzetti mostrano dei rapidi sviluppi di colore in dei singoli punti del pozzetto, ciò può essere dovuto al coniugato enzimatico, che non è stato lavato via completamente. Trattare ogni risultato con cautela.

9. Aggiungere 100µl di soluzione stoppante (**Reagente 5**) in ogni pozzetto. Permettere uguale tempo di reazione. La soluzione stoppante deve essere aggiunte 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 un riferimento di lunghezza d'onda.

Controllo di qualità.

1. I valori di OD attesi nei ranges accettabili per gli standard ed il controllo positivo sono riportati sul certificato accluso al kit.
2. Il controllo positivo è inteso per monitorare eventuali insuccessi dei reagenti.
3. Dei pozzetti positivi con lo spettrofotometro ma senza colore visibile devono essere cancellati nella parte inferiore e rilette. Se si verificano valori sotto lo zero, la lunghezza d'onda usata deve essere verificata, e la lettura ripetuta.

Interpretazione dei risultati.

Segnare la OD dello 0 e 25U/ml standard contro la concentrazione e disegnare una linea dritta attraverso i punti. Leggere i punti sconosciuti fuori dalla curva. La seguente tabella propone range di concentrazione e gradi per differenti reazioni di anticorpi di alimenti:

Response	Range (AU/ml) ¹	Grade
Negative	<8	0
Borderline	8 - 12.5	1 (Equivocal)
Positive	12.5 - 25.0	2+
Strong positive	>25.0	3+

¹ Units are arbitrary Genesis units.

Questi sono i ranges basati sugli studi della Genesis Diagnostics. Coloro che usano il kit dovrebbero verificare questi ranger nei loro propri laboratori .

Limitazioni della procedura

1. I risultati devono essere sempre correlati con le condizioni cliniche del paziente giacché aumentati valori di livelli non manifestano dei sintomi specifici.
2. I risultati di questo kit non danno informazioni sulle allergia IgE.

Caratteristiche

Precisione entro la piastra < 20%

Per la disposizione degli antigeni sulla piastra vedasi tabella acclusa al kit. (109 alimenti)

Metodica in breve

- Aggiungere 25µl di campione a 10ml di Diluente (**Reagente 1**)
- Dispensare Standards, controllo positivo, e campione diluito nei pozzetti specifici della micropiastra .
- Incubare **30** minuti a temperatura ambiente.
- *Lavare i pozzetti per tre volte.*
- Dispensare 100µl di coniugato (**Reagente 3**) nei pozzetti
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
- *Lavare i pozzetti per 4 volte.*
- Aggiungere 100µl di TMB (**Reagente 4**) in ogni pozzetto
- Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti
- Aggiungere 100µl di soluzione Stop (**Reagente 5**) a ogni pozzetto
- Leggere la OD a 450nm (singola lunghezza d'onda) o a 450/620nm (doppia lunghezza d'onda).

Produced for:



distributore esclusivo per l'Italia

V.le Europa, 22 is. 57

98124 MESSINA

Tel. 090-696001

Fax. 090-695563

e-mail: betadiagnostici@tin.it

web: www.betadiagnostici.it