



Manuale d'uso

Versione 1.3

AbTest Plus

*Kit per la determinazione quantitativa delle IgG
o IgG4 contro antigeni alimentari*



CE



Sommario

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO	3
Destinazione d'uso	3
CONTENUTO DEL KIT	3
APPLICAZIONE, CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI	4
PRECAUZIONI DI UTILIZZO	4
NORME DI SICUREZZA	5
Norme di sicurezza generali	5
Norme di sicurezza relative al prodotto.....	6
MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI	6
Reagenti.....	6
Strumentazione.....	6
Materiali	6
INTRODUZIONE	9
PRINCIPIO DEL METODO	9
RACCOLTA. MANIPOLAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE	10
PROTOCOLLO DI ANALISI	11
Preparazione prima dell'uso.....	11
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	12
VALORI ATTESI	13
LIMITAZIONI DEL DISPOSITIVO	13
PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO	13
Specificità.....	14
Sensibilità analitica:	14
AbTest Plus - Sistema di Refertazione	14
Guida Introduttiva	14
BIBLIOGRAFIA	18

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Destinazione d'uso

Il kit AbTest Plus è un IVD per la determinazione quantitativa delle IgG o IgG4 (a seconda della configurazione scelta) umane contro antigeni alimentari

Il presente manuale è relativo ai seguenti prodotti:

CODICE	PRODOTTO	FORMATO	ANALITA
AB-IGG-5	AbTest Plus 130	5 test	IgG
AB-IGG-6	AbTest Plus 60	6 test	IgG
AB-IGG-4	AbTest Plus 30	12 test	IgG
AB-IGG4-5	AbTest Plus 130 G4	5 test	IgG ₄
AB-IGG4-6	AbTest Plus 60 G4	6 test	IgG ₄
AB-IGG4-30	AbTest Plus 30 G4	12 test	IgG ₄

CONTENUTO DEL KIT

Il kit contiene i reagenti necessari eseguire la metodica.

Componenti:

- Diluent
- Conjugate
- Substrato
- Stop solution
- Soluzione di lavaggio 20x
- Calibratori 1-4
- Controllo Positivo
- Controllo Negativo
- micropiastre da 96 pozzetti

Conservare tutto a + 4°- 8° C

APPLICAZIONE, CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Il kit AbTest Plus è stato studiato per la determinazione delle IgG o IgG₄ contro antigeni alimentari.

Si tenga in considerazione che i calibratori devono essere misurati in ogni determinazione, così come il controllo negativo e il controllo positivo.

NOTA: Se usato parzialmente, il kit deve essere usato entro 1 mese.

Il kit deve essere conservato secondo le indicazioni riportate nell'etichetta della scatola. Se conservato alla temperatura indicata il kit è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

Dopo l'apertura tutti i componenti dovrebbero essere conservati in condizioni di temperatura appropriate riportate sull'etichetta. Il reagente *Substrate* deve essere conservato al riparo dalla luce. La sensibilità del kit potrebbe ridursi più del 50% dopo la data di scadenza o se non conservato nei modi indicati.

I calibratori e i controlli devono essere conservati a +2...8° C per non più di un mese.

NOTA: Non è possibile travasare i calibratori in altre provette poiché potrebbero degradarsi.

PRECAZUZIONI DI UTILIZZO

- Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente *in vitro* da personale opportunamente addestrato e istruito in merito alle tecniche di biologia molecolare;
- Prima dell'utilizzo del dispositivo, leggere attentamente il manuale d'uso in tutte le sue parti;

- Deve essere prestata particolare attenzione alla data di scadenza riportata nell'etichetta di ciascuna confezione del kit; non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza;
- In caso di dubbi sulla corretta conservazione del prodotto o sull'integrità della confezione, prima dell'utilizzo contattare il servizio tecnico di BIOLAB (info@ebiolab.it);

Precauzioni tecniche:

- Utilizzare puntali sterili;
- Conservare i campioni biologici da testare in luogo separato dai reagenti del kit
- Cambiarsi regolarmente i guanti
- Pulire le superfici di lavoro con ipoclorito di sodio al 5%;
- Dopo il prelievo del campione biologico conservare il siero/plasma a -20°C
- I componenti vanno scongelati a temperatura ambiente al riparo dalla luce diretta

NORME DI SICUREZZA

Norme di sicurezza generali

- Indossare guanti monouso nel manipolare reagenti chimici e campioni clinici e lavarsi le mani una volta terminato il lavoro;
- Non pipettare con la bocca;
- I campioni di sangue umano (inclusi i campioni dei pazienti) devono essere considerati come potenzialmente infetti.

- Occorre prendere ogni precauzione per evitare la contaminazione dei componenti del kit.
- Non mescolare componenti di kit diversi con differenti numeri di lotto
- Non usare nessun componente del kit dopo la data di scadenza
- I campioni clinici, materiali e prodotti contaminati devono essere smaltiti secondo le norme vigenti

Norme di sicurezza relative al prodotto

- La Stop Solution contiene acido solforico. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. In caso di contatto lavare immediatamente con acqua e contattare un medico.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Reagenti

- Acqua sterile distillata;










Strumentazione




- Pipette e puntali (Pipetta multicanale a 8 canali raccomandata)
- Cilindro graduato
- Incubatore 37° C
- Lettore per Micropiastre da 96 pozzetti (450nm)

Materiali

- Guanti monouso

COMPONENTI DEL KIT

Articolo	Descrizione	Quantità	Labels
Piastre	Piastre Elisa da 96 pozzetti. Pronte per l'utilizzo	n3 AB- IGG-6 AB-IGG4-6 n5 AB- IGG-5 AB-IGG4-5 n4 AB-IGG-4 AB-IGG4-4	 AbTest Plus 130 IgG4 ELISA Plates Store @ +4° C CE IVD
Calibratori	4 x 1,5 mL di standards contenenti diluizioni seriali di IgG / IgG4. Pronti per l'utilizzo	4	 Store @ +4°C Calibrator 1 1.25 U / ml CE IVD  Store @ +4°C Calibrator 2 2.50 U / ml CE IVD  Store @ +4°C Calibrator 3 5.00 U / ml CE IVD  Store @ +4°C Calibrator 4 10.00 U / ml CE IVD
Controlli	1 x 1,5 mL controllo positivo contenente titolo noto di IgG / IgG4. 1 x 1,5 mL controllo negativo contenente PBS. Pronti per l'utilizzo	1 + 1	 Store @ +4°C Positive Control CE IVD  Store @ +4°C Negative Control CE IVD
Conjugate	Anti-Human IgG / IgG4 Fc HRP in soluzione. Pronti per l'utilizzo.	1	 Store @ +4°C Conjugate CE IVD
Diluent	Tris /Bsa buffer. Pronto per l'utilizzo.	1	 Store @ +4°C Diluent CE IVD

Substrate	TMB buffer. Pronto per l'utilizzo.	1	 Store @ +4°C Substrate CE IVD
Stop Solution	1N di H ₂ SO ₄ Pronto per l'utilizzo.	1	 Store @ +4°C Stop Solution CE IVD
Wash buffer 20X	TBS + TWEEN . Diluire 1+ 19 di acqua distillata	2	 Store @ +4°C Wash Buffer 20X CE IVD
Film plastico	Pellicole per coprire le piastre durante l'incubazione	5	-
Quality Control Certificate		1	-
Layout Plate	Schema di distribuzione degli antigeni nei singoli pozzetti	1	-

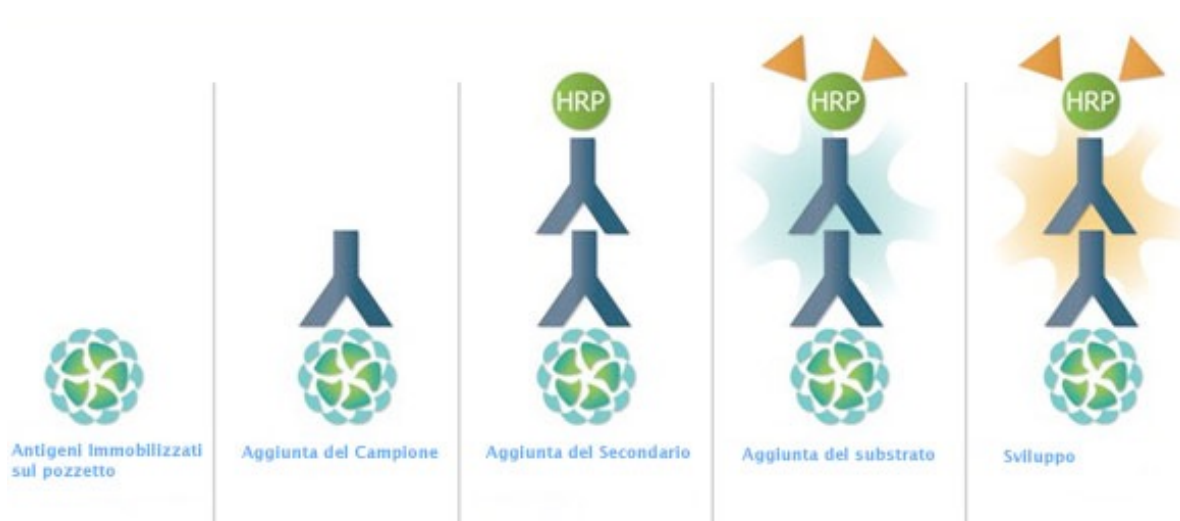
INTRODUZIONE

AbTest è stato sviluppato per la determinazione quantitativa delle IgG e IgG₄ nel siero umano dirette verso antigeni alimentari usando strumentazione ELISA standard del laboratorio clinico. Recentemente, le immunoglobuline IgG e IgG₄ sono state correlate con le intolleranze alimentari. In pazienti che mostravano una reazione avversa cibi avevano aumentato nel sangue, fino a 72h, livelli significativi di anticorpi diretti contro l'antigene alimentare causativo. Inoltre, è stato dimostrato che una dieta ad esclusione si è dimostrata efficace nell'alleviare i sintomi derivati dalla reazione avversa ai cibi.

Queste scoperte candidano le IgG e le IgG₄ come la principale causa dei disturbi derivati dal consumo di alcuni cibi.

PRINCIPIO DEL METODO

AbTest, al contrario di altri test ELISA per la determinazione intolleranze alimentari, si basa sull'utilizzo di estratti alimentari freschi italiani e di altissima qualità. Inoltre, l'altissima sensibilità e specificità del test permette l'uso di 50 ul di siero umano permettendo l'analisi anche di campioni di sangue capillare. Dopo l'aggiunta del siero del paziente, gli anticorpi



formeranno complessi con gli antigeni immobilizzati sui pozzetti della piastra diventando rilevabili grazie alla conversione enzimatica del substrato TMB ad un composto di colore blu mediante la perossidasi. Dopo l'aggiunta della soluzione di stop, il substrato vira da blu a giallo in seguito al cambiamento di ph. L'intensità di colore è misurabile a 450nm

mediante un lettore di micropiastre standard è direttamente proporzionale alla concentrazione degli anticorpi nel siero del paziente.

RACCOLTA. MANIPOLAZIONE E PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

Raccolta e conservazione del campione:

Il sangue è raccolto asepticamente mediante prelievo venoso o capillare. Dopo coagulazione, il siero viene separato mediante centrifugazione. Plasma, siero fortemente lipemico o con aggiunta di sodio azide come conservante non dovrebbe essere usato. L'emolisi non influenza il test.

Il siero può essere conservato a +2...8° C per non più di 3 giorni. Per conservazioni più lunghe si raccomanda di aliquotare il campione e conservarlo a -20° C- Evitare cicli di congelamento/scongelo.

Preparazione del campione prima dell'uso:

Prima del test, portare i campioni a temperatura ambiente (+18...25° C). Mescolare bene il campione. **Il campione va diluito 1:100 con il reagente Diluent fornito nel kit.** La diluizione da effettuare è la seguente:

REF	SIERO	DILUENT
AB- IGG-6 AB-IGG4-6	25 ul	2475 ul
AB- IGG-5 AB-IGG4-5	50 ul	4950 ul
AB-IGG-4 AB-IGG4-4	15 ul	1485 ul

Il campione va diluito esclusivamente con reagente diluent fornito dal kit, non utilizzare altre sostanze.

PROTOCOLLO DI ANALISI

Preparazione prima dell'uso

Portare tutti i componenti del kit a temperatura ambiente (+18...25° C). Preparare la quantità necessaria di wash buffer diluendo 1:20 con acqua distillata. Per esempio:

- 10 ml wash buffer + 190 ml di acqua distillata.

Mescolare delicatamente evitando la formazione di schiuma. Conservare a temperatura ambiente per non più di 20 giorni. Il reagente substrate è sensibile alla luce.

Calibrazione dello zero

Per la calibrazione dello zero è possibile utilizzare la media delle assorbanze dei pozzetti C-. Per facilitare l'operazione dei calcoli e della refertazione è possibile utilizzare il software fornito gratuitamente (guida in allegato al kit) disponibile su www.abtestplus.it

Procedura di analisi

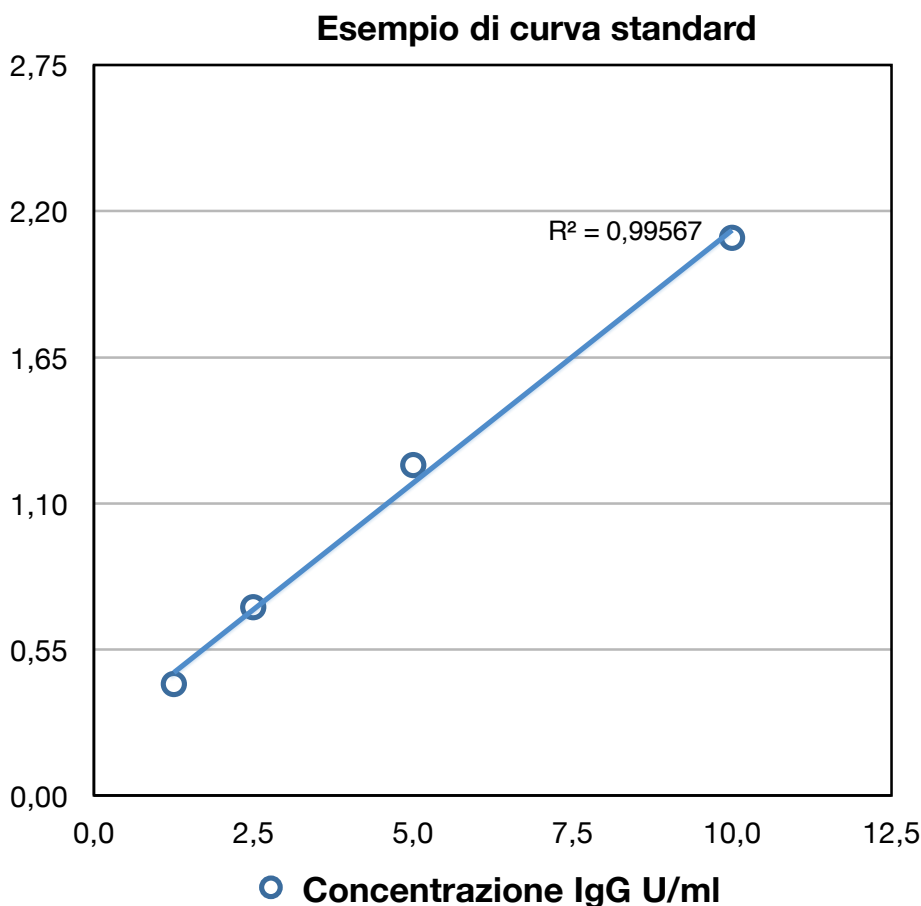
1. Diluire la soluzione di lavaggio (20x) con acqua distillata per ottenere una soluzione 1x
2. Diluire il siero umano 1:100
3. Aggiungere 50 ul di siero diluito in ogni pozzetto e 50 ul di calibratori e controlli.(guardare schema allegato)
- Osservare il layout della piastra prima di eseguire il test. Si consiglia l'uso di una mangiatoia per pescare i reagenti.
4. Incubare per 30 minuti a 37° C
- N.B. Usare un il film fornito per coprire la piastra durante le incubazioni
5. Lavare 3 volte con 200 ul di wash buffer 1X
- N.B. Usare una pipetta multicanale (8 canali) per effettuare i lavaggio
6. Aggiungere 50 ul di conjugate in ogni pozzetto
7. Incubare per 60 minuti a 37°C
8. Lavare 5 volte con 200 ul di wash buffer 1X
9. Aggiungere 50 ul di substrate (TMB) in ogni pozzetto
10. Incubare per 10-15 minuti a 37°C al riparo dalla luce
11. Aggiungere 50 ul di stop solution in ogni pozzetto

12. Misurare l'intensità di colore a 450nm usando un lettore MTP
13. Utilizzare la media dei pozzetti C- per la calibrazione dello zero.

- E' consigliabile misurare l'intensità di colore immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione di stop. Eventualmente il risultato può essere letto anche dopo 15 minuti.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'analisi dei dati può essere effettuata mediante la generazione della curva standard graficando la media delle OD dei calibratori a 450 nm contro i rispettivi valori delle IgG (Si consiglia di utilizzare una 4PL o 5PL o in alternativa una regressione lineare). Si consiglia l'uso di un software per la generazione e il calcolo dei valori (Es. Excel, GraphPad, OpenOffice Calc). L' OD dei pozzetti della piastra del controllo negativo (C-) deve essere usata come zero quindi va sottratta all'assorbanza dei pozzetti del campione. In alternativa è possibile utilizzare il software fornito gratuitamente su www.abtestplus.it (nel kit è inclusa la guida)



VALORI ATTESI

Nei soggetti normali o con un intolleranza bassa il range di concentrazione è inferiore a 2 U/ml. Soggetti con un range compreso tra 2 - 5 U/ml possono essere definiti moderatamente intolleranti. Soggetti con un range superiore a 5 possono essere definiti come soggetti con una forte intolleranza.

I valori di riferimento sono stati ottenuti mediante l'analisi statistica dei dati raccolti da circa 5000 pazienti .

LIMITAZIONI DEL DISPOSITIVO

Il kit può avere delle prestazioni ridotte qualora:

- Il campione clinico non sia idoneo all'indagine (es. sangue trattato con sodio azide, conservazione errata, forte emolisi)
- il kit non sia stato conservato in condizioni idonee

La diagnosi clinica non può essere basata solo ed esclusivamente sul risultato del test in vitro. Per elaborare una diagnosi il clinico deve considerare tutti i risultati clinici disponibili.

PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO

INTER-LOT PRECISION

Cut off n=21	Lot 123	Lot 124	Lot 125
O.D. of Cow Milk Antibody	0.346	0.311	0.368
CV%	11.3	9.72	4.9

“INTER-LOT” and “INTER-SAMPLE” PRECISION

Sample	IU/ml of Cow Milk Antibody				CV%
	Lot 123	Lot 124	Lot 125	Lot 126	
n. 1	5,7	6,2	5,9	6	6,2
n. 2	11,4	10,2	11,1	10,8	7.20

Specificità

In accordo con le specifiche del prodotto fornite dal fornitore, non c'è cross reattività tra l'anti-IgG o IgG4 usato nel test e le altre immunoglobuline (IgA, IgE, IgM, IgG).

Sensibilità analitica

La più bassa concentrazione di IgG o IgG4 distinguibile è di 0,31 U/ml.

AbTest Plus - Sistema di Refertazione

Guida Introduttiva

Con l'acquisto di uno dei kit AbTest Plus si ha accesso al sistema di refertazione che permette di inserire i dati grezzi (assorbanze, OD) ricavati dalla lettura della micropiastre in modo ottenere i dati elaborati e un referto personalizzato.

Il programma è accessibile da www.abtestplus.it, www.abtestplus.com.

Inserire le credenziali di accesso riportate all'interno della confezione del kit.

Inserisci le tue credenziali

Codice kit	<input type="text" value="codice identificativo del kit"/>
Password	<input type="text" value="password del kit"/>
<input type="button" value="Accedi"/>	

Una volta inserite le credenziali si ha accesso al programma che si presenta come riportato in figura.

YABTEST Kit G1540326-001
INTOLLERANZE ALIMENTARI

AB Test plus - gestione piastre

Logout **BIOLAB**

Piastre Paziente

G1540326-001.P.1 **E**

G1540326-001.P.2 **Nuova**

G1540326-001.P.3 **Nuova**

Dati laboratorio

[Intestazione referto](#)

Legenda stati piastra:
R: Nuova - non ancora utilizzata
E: Eseguito, alcuni valori inseriti
V: Validato, pronto per emissione referti
F: Firmato, referti emessi

Situazione piastre

#	Stato	Codice	Intestazione Paziente
1	E	G1540326-001.P.1	
		#	Codice episodio
		1	G1540326-001.P.1.1
			dati paziente
			Salva
		2	G1540326-001.P.1.2
			dati paziente
			Salva
2	R	G1540326-001.P.2	
3	R	G1540326-001.P.3	

Soluzioni Innovative
©2015 Soluzioni Innovative Srl

Da questa schermata è possibile gestire le informazioni relative alle piastre dei pazienti. La prima operazione è quella dell'inserimento dei valori grezzi (OD) della piastra del paziente cliccando sui link sotto piastra paziente. Il numero di piastre disponibili dipende dal kit acquistato (es. 3 piastre per il kit da 60 alimenti). Le piastre sono nominate con il numero di lotto seguito dalla sigla .P.1 per il paziente uno e .P.2 per il paziente due e così via.

Piastre Paziente

G1540326-001.P.1 **F**

G1540326-001.P.2 **F**

G1540326-001.P.3 **Nuova**

Si aprirà una schermata come sotto:

The screenshot shows a software interface for managing laboratory plate data. At the top, there is a navigation bar with buttons: 'Salva' (blue), 'Valida' (white), 'Devalida' (white), 'Gestione piastre' (blue), 'Stato R' (white), 'Calcolati' (white), and 'Originali' (orange). Below this is a grid of 96 wells arranged in 8 rows (A-H) and 12 columns (1-12). Each well is represented by a small box with its label (e.g., A1, A2, ..., H12). The first two columns of each row are highlighted in different colors: Row A (A1, A2) in teal; Row B (B1, B2) in teal; Row C (C1, C2) in teal; Row D (D1, D2) in teal; Row E (E1, E2) in teal; Row F (F1, F2) in teal; Row G (G1, G2) in light green; Row H (H1, H2) in light orange.

In questa schermata occorre inserire i dati degli standard e dei controlli oltre a tutti i dati dei pozzetti ottenuti mediante la lettura della piastra dove è stato analizzato il siero del paziente. Una volta inseriti tutti i dati occorre cliccare su valida. Il Bottone ORIGINALI mostra i dati grezzi (OD, assorbanze), il Bottone CALCOLATI mostra i dati elaborati. Per stampare il referto occorre tornare a GESTIONE PIASTRE.

Nella gestione Piastre troveremo questa schermata.

The screenshot shows a form for patient information. On the left, there is a text input field containing the patient ID 'G1540326-001.P.2.2'. To its right is a larger text input field containing the text 'Paziente di Prova'. To the right of this field are three stacked buttons: 'Salva' (blue), 'Stampa prova' (blue), and 'Stampa definitiva' (blue).

Nella campo dove è riportato Paziente di Prova, è possibile inserire l'intestazione del paziente. Una volta inserito il nome occorre cliccare su SALVA. Cliccando su stampa di prova è possibile visualizzare un anteprima del referto. Cliccando su STAMPA DEFINITIVA è possibile stampare il referto definitivo. Una volta stampato definitivamente Il referto non può essere più modificato.

Nella sezione Dati Laboratorio è possibile inserire l'intestazione del laboratorio.

Dati laboratorio

[Intestazione referto](#)

Una volta finito l'inserimento dei dati cliccare su LOGOUT.

BIBLIOGRAFIA

- Zar et al. American Journal of Gastroenterology, 2005
- Rajendran et al, Colorectal Disease, 2011
- Zar et al , Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2005;
- ROB C. et al, Immunology, 2002
- Noh G et al, Pediatr Allergy Immunol, 2007



Assistenza Tecnica

Tel. 0736 41844
Cell. 334 6697040

Assistenza Informatica

Tel. 0885 420462



Biolab S.r.l.
Viale dei Platani,8
63100 Ascoli Piceno (AP)
P.I. 02083900445
T/F 0736845550 - info@ebiolab.it