

Teste Quantitativo para a investigação de sensibilidade à alimentos mediada por IgG

Artigo: GD201-1 (4 pacientes)

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

200110

1. Uso Previsto

O Genarray™ 200 + Kit IgG de Alimentos é um ELISA baseado em *microarray* colorimétrico rápido para a medição de anticorpos IgG para 221 alimentos em sangue total, soro ou plasma humano.

2. Explicação do Teste

Muitas pessoas exibem reações crônicas de sensibilidade à alimentos para antígenos de alimentos específicos. Diferente dos efeitos imediatos da alergia mediada por IgE, as reações de sensibilidade à alimentos mediada por IgG podem levar vários dias para aparecerem. A remoção controlada dos alimentos que causam problemas da dieta do paciente irá, em muitos casos, rapidamente melhorar a condição do paciente. A letargia geral, ganho de peso, dermatite, artrite e fadiga estão associadas com alergias a alimentos. A síndrome do intestino irritável pode também ter ligação com a sensibilidade à alimentos.

3. Princípio do Teste

221 extratos de alimentos foram microarranjados em um bloco de nitrocelulose em uma lâmina de microscópio de vidro. Os extratos de alimentos são incubados com o sangue total, soro ou plasma diluído do paciente. Após lavar tirando os componentes do soro não ligados, a anti-IgG humana conjugada à peroxidase de rábano silvestre é adicionada ao bloco e esta se liga aos anticorpos ligados aos extratos de alimentos na primeira incubação. O conjugado não ligado é removido com lavagem e uma solução contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e substrato de enzima é adicionado para rastrear a ligação do anticorpo específico. Após a lavagem com água destilada, a lâmina é secada através de centrifugação antes de escanear. As densidades ópticas dos padrões, controles positivos e negativos e amostras são medidas usando um scanner de base horizontal de alta resolução com software associado.

4. Materiais Incluídos no Kit

- **4 x 1 *microarrays* de alimentos** em lâminas de vidro modificadas em um suporte de lâmina; selado em embalagem metálica com dessecante. Cada *microarray* abrange 221 extratos de alimentos.
- **Diluyente de Amostra:** 10 mM de Salina tamponada com Tris, pH 7.2 com 0.09% de Azida Sódica e proteínas; 10 mL, pronto para uso; tampa azul.
- **Tampão de Lavagem:** 10 mM de Salina tamponada com Tris, pH 7.2, com detergente; 100 mL; pronto para uso.
- **Conjugado:** anti-IgG humana de cabra conjugada à peroxidase de rábano silvestre; 10 mL, pronto para uso; tampa vermelha
- **Substrato TMB:** solução aquosa de TMB e agente oxidante suave, 10 mL, pronto para uso.
- 1 placa de microtitulação com 96 poços.
- Instruções de Uso.

5. Outros Equipamentos Necessários

- Pipetas de único canal e ponteiras para dispensar de 5 µL a 250 µL • água destilada ou deionizada • moldura de lâmina • centrífuga • estação de lavagem • scanner de base horizontal de alta resolução com computador associado e software de rastreamento de pontos • Software de relatório para impressão FOODPRINT® Genarray™

6. Precauções**6.1 Precauções de Segurança**

1. Somente pessoas com experiência em laboratório devem utilizar esse teste. O protocolo do teste deve ser rigorosamente seguido.
2. A IgG humana usada na preparação do Padrão e do Controle Positivo para esse produto foi testada e teve resultado negativo para anticorpos de HIV, HbsAg e HCV. Nenhum método de teste, entretanto, pode oferecer completa segurança de que não existam agentes infecciosos. Portanto, todos os reagentes contendo material humano devem ser manuseados como potencialmente infecciosos. Os operadores devem usar luvas de exame livres de pó e roupa de proteção quando manusearem soros de pacientes ou produtos baseados em soro durante todo o procedimento do teste.
3. O Diluyente de Amostra contém 0.09% de Azida Sódica. Evite contato com a pele e olhos. Lave imediatamente com água abundante se ocorrer qualquer contato. Jogue grandes quantidades de água nas pias após o descarte desses reagentes.
4. As amostras diluídas e qualquer líquido que tenha entrado em contato com material potencialmente infeccioso deve ser descartado em um recipiente com desinfetante. O descarte deve ser realizado de acordo com a legislação local.
5. O suporte para moldura de lâmina deve ser desinfetado após o uso.

6.2 Precauções Técnicas

1. Os *microarrays* não devem ser usados se a embalagem metálica estiver danificada e as soluções não devem ser usadas se os líquidos tiverem vazado.
2. Os reagentes e os *microarrays* devem estar em temperatura ambiente antes de serem usados.
3. Observe rigorosamente os tempos e temperatura de incubação indicados.
4. Assegure-se de que não ocorra contaminação cruzada entre os blocos.
5. Nunca despeje os reagentes não usados de volta nos frascos originais.
6. Não deixe os *microarrays* secarem entre as etapas de incubação.
7. Siga rigorosamente o procedimento de lavagem descrito. A lavagem insuficiente pode causar um sinal de fundo alto.
8. Evite a luz direta e a exposição à fontes de aquecimento durante todas as etapas de incubação.
9. Recoloque as tampas com códigos de cores nos seus frascos corretos para evitar contaminação cruzada.
10. Utilize luvas de nitrilo livres de pó quando manusear as lâminas de *microarray* e luvas de exames quando manusear amostras de pacientes.

7. Prazo de Validade e Condições de Armazenamento

Na chegada, armazene o kit à 2 – 8 °C. Não use kits com a data de validade vencida. Não congele nenhum componente do kit.

8. Coleta da Amostra e Armazenamento

Amostras de soro, plasma ou sangue total podem ser usadas. O soro e plasma devem ser armazenados à -20°C se for por longo prazo. As amostras congeladas devem ser bem misturadas após serem descongeladas e antes do teste. Congelar e descongelar repetidas vezes pode afetar os resultados. Amostras com contaminação microbiana, aquecidas ou contendo partículas de substâncias não devem ser usadas. Amostras muito hemolisadas, ictericas ou lipêmicas devem ser evitadas.

9. Preparo das Amostras

Dilua as amostras 1:49 no diluyente de amostra, adicionando 5 µL de soro/plasma e 245 µL de Diluyente de Amostra. Para sangue total, dilua as amostras 1:24 adicionando 10 µL de sangue total e 240 µL de diluyente de amostra.

As amostras podem ser diluídas diretamente dentro da placa de microtitulação de 96 poços ou dentro dos microtubos e então transferidas para dentro da placa de microtitulação de 96 poços, se for necessário. Quando transferir as amostras para a placa de microtitulação, registre a posição do poço para cada amostra pois isso irá ditar a posição da amostra nas lâminas de *microarray*. Por exemplo, o poço A1 corresponde à lâmina 1 bloco 1.

| | |
|---------|--|
| Bloco 1 | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| X | |

10. Procedimento do Teste

1. Coloque as lâminas e câmaras dentro do suporte para lâminas com o lado da membrana voltado para cima. O ponto branco deve estar no canto esquerdo inferior da câmara.
2. Usando uma pipeta, adicione 100 µL da amostra do paciente diluída (no Diluente de Amostra) no bloco. Cubra e incube por 30 minutos.
3. Descarte o conteúdo da lâmina com um rápido movimento em um recipiente de material contaminado. Adicione 120 µL do tampão de lavagem no bloco e agite dando leves batidas no lado da moldura. Repita essa etapa mais 2 vezes. Cubra e incube por 5 minutos.
4. Descarte o conteúdo da lâmina com um rápido movimento em um recipiente de material contaminado. Adicione 120 µL de tampão de lavagem no bloco e agite dando leves batidas como na etapa 3. Cubra e incube por 5 minutos. Descarte o tampão de lavagem. Não deixe a lâmina secar.
5. Usando uma pipeta, adicione 100 µL do conjugado no bloco. Cubra e incube por 30 minutos.
6. Descarte o conteúdo da lâmina com um rápido movimento em um recipiente de material contaminado. Adicione 120 µL de tampão de lavagem no bloco e agite dando leves batidas. Repita essa etapa mais 2 vezes. Cubra e incube por 5 minutos.
7. Descartar o conteúdo da lâmina com um rápido movimento em um recipiente de material contaminado. Adicione 120 µL do tampão de lavagem no bloco e agite dando leves batidas. Cubra e incube por 5 minutos. Descartar o tampão de lavagem. Não deixe a lâmina secar.
8. Usando uma pipeta, adicione 100 µL da membrana TMB no bloco. Cubra e incube por 10 minutos.
9. Remova suavemente as lâminas do suporte para lâminas e cuidadosamente coloque dentro da estação de lavagem contendo 400 mL de água destilada/deionizada por 2 minutos. NÃO AGITE.
10. Cuidadosamente remova as lâminas e seque-as na centrífuga Genarray™ por 30 segundos. Os *microarrays* agora estão prontos para escanear.
11. Escaneie usando um scanner de base horizontal de alta resolução.

11. Controle de Qualidade

1. Os *microarrays* incluem controles positivos e negativos e têm a finalidade de monitorar falhas importantes do reagente.

12. Interpretação dos Resultados

| Resposta | Faixa (U/mL) ¹ |
|-----------|---------------------------|
| Negativa | < 24 |
| Limitrofe | 24 – 30 |
| Positiva | > 30 |

Os resultados são derivados de padrões internos de IgG incluídos no arranjo ("array").

¹ As unidades são unidades arbitrárias da Genesis.

Essas são as faixas sugeridas baseadas em estudos internos da Genesis Diagnostics Ltd. Os usuários do kit devem verificar essas faixas nos seus próprios laboratórios sob as condições locais e ajustá-las, se necessário.

13. Limitações do Procedimento

1. Os resultados devem sempre ser correlacionados com a condição clínica do paciente, já que um nível aumentado de IgG de alimento não precisa se manifestar com nenhum sintoma específico.
2. É importante lembrar que os resultados desse kit não dão informações sobre alergias mediadas por IgE.

14. Características do Teste

Imprecisão dentro do teste < 12%
Imprecisão entre testes < 22%

15. 221 IgG de Alimentos – Esquema do Antígeno de Alimento

Resumo do Método

- Pipete a amostra diluída no *microarray*.
- Cubra e incube por **30** minutos em temperatura ambiente.
- Lave o *microarray* 3 vezes e incube com tampão de lavagem por **5** minutos.
- Lave mais uma vez e incube com tampão de lavagem por **5** minutos.
- Dispense 100 µL de conjugado no *microarray*.
- Incube em temperatura ambiente por **30** minutos.
- Lave o *microarray* 3 vezes e incube com tampão de lavagem por **5** minutos.
- Lave mais uma vez e incube com tampão de lavagem por **5** minutos.
- Incube com 100 µL de membrana TMB por **10** minutos.
- Coloque as lâminas dentro de uma estação de lavagem contendo água e incube por **2** minutos.
- Seque as lâminas em uma centrífuga por **30** segundos.
- Escaneie o *microarray* utilizando um scanner de base horizontal de alta resolução e aplique o software de rastreamento de pontos.
- Processe os dados usando o software de relatório para impressão Foodprint®.

Veja o software de relatório de alimentos fornecido com o kit.

16. Garantia

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

17. Gerenciamento de Resíduos

Seguir as disposições da resolução sobre o regulamento técnico para gerenciamento de resíduos de serviços de saúde bem como outras práticas de biossegurança equivalentes, revisão em vigor.

16. Leitura Adicional

- Atkinson et al. IgG antibodies in IBS, Gut 2004;53:1459-1464.
- James M. Toward an understanding of allergy and in vitro testing. Nat. Med. Journal, 1999; 2 (4): 7-15.
- Gaby AR. The role of hidden food allergy/intolerance in chronic disease. Alt. Med. Review, 1998; 3(2): 90-100.
- Hofman T. IgE and IgG antibodies in children with food allergy. Roc. Akad. Med. Bialmyst, 1995; 40 (3): 468-473
- Sampson HA, Metcalfe DD. Food allergies. JAMA, 1992; 268 (20): 2840-2844.
- El Rafei A. et al. Diagnostic value of IgG4 measurement in patients with food allergy. Ann. Allergy, 1989; 62: 94-99.

Fabricado por: Genesis Diagnostics LTD.
Importado e Distribuído por: BioSys LTDA.
CNPJ: 02220795/0001-79
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Niterói, RJ.
CEP: 24.020-062
MS/ANVISA: 10350840181
Responsável técnico:
Vera Lúcia Alves Janoni – CRF: 2848
SAC: + 55 (21) 3907-2534
sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br