

НАБОР ИФА

ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АУТОАНТИТЕЛ К ДЕКАРБОКСИЛАЗЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

7009, Isletest-GAD

Каталог. № : 7009

Методика от 11-2012

Количество : 96

Производитель: **BIOMERICA INC., (США)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

I. НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор предназначен для определения циркулирующих аутоантител к антигену - декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD) с целью оценки риска развития инсулинозависимого сахарного диабета (ИЗСД).

II. ВВЕДЕНИЕ

Инсулинозависимый диабет (ИЗСД) или диабет первого типа представляет собой тяжёлое хроническое заболевание, характеризующееся аутоиммунной деструкцией бета-клеток поджелудочной железы (1, 2). Селективный иммунодефицит является причиной нарушения секреции инсулина. Иммунологическое обследование выявляет наличие специфических аутоантител к бета-клеткам островков Лангерганса у пациентов с ИЗСД (3). Идентифицированы по меньшей мере три типа антител против антигенных компонентов клеток островков Лангерганса у больных ИЗСД. Это антитела против клеточных компонентов β -клеток островков Лангерганса (4), против декарбоксилазы глутаминовой кислоты (5) и инсулина (6).

GAD - фермент биосинтеза тормозящего нейромедиатора – гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (7). Две формы GAD, 65 КД и 67 КД, продуцируются единственным геном и обладают высокой гомогенностью (8-10). Эти формы выделены из мозга и островковых клеток и по-разному экспрессируются поджелудочной железой человека, крысы и мыши (11, 12).

Диабет – это хроническое аутоиммунное заболевание, сопровождающееся деструкцией β -клеток островков Лангерганса, поэтому очень важен ранний и точный прогноз заболевания на преклинической (асимптоматической) стадии, чтобы иметь возможность остановить клеточную деструкцию и максимально сохранить клеточную массу β -клеток. Скрининг группы высокого риска для всех трёх типов антител (антитела к компонентам островковых клеток, антиинсулиновые и антитела к декарбоксилазе глутаминовой кислоты) поможет предотвратить или снизить заболеваемость диабетом. У лиц из группы риска, имеющих антитела к двум и более антигенам, диабет развивается в течение 5 – 7 лет (13, 14).

III. ПРИНЦИП МЕТОДА

Тест основан на принципе твердофазного непрямого иммуноферментного анализа. Высокоочищенный антиген GAD адсорбирован на стенках лунок микропланшета. При нанесении исследуемых сывороток в лунки, присутствующие в них IgG-антитела к GAD связываются с иммобилизованными антигенами. Несвязавшиеся антитела удаляются в результате промывки. После этого в лунки вносятся козы антитела к IgG человека, меченые ферментом (конъюгат), которые связываются с комплексом "антиген-антитело", иммобилизованным на поверхности лунок. Несвязавшийся конъюгат удаляется в результате второй промывки. Добавление субстрата приводит к развитию окраски, интенсивность которой измеряется спектрофотометрически. Оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации GAD в образце. Результаты рассчитываются на основании сравнения оптической плотности (ОП) образца со значениями ОП калибраторов по калибровочному графику. Положительный и отрицательный контроль служат внутренними контролями качества, гарантирующими правильность получаемых результатов.

IV. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Все реагенты, предоставляемые с набором, предназначены только для in-vitro диагностики.

1. Материалы, представляющие потенциальную инфекционную опасность

Калибраторы и Контроли, входящие в состав набора, приготовлены на основе человеческой сыворотки. Образцы сыворотки, использованные при их приготовлении, имели отрицательные результаты при исследовании FDA-лицензированными реагентами на наличие антител к БИЧ и поверхностного антигена гепатита В. Тем не менее, так как не существует методов, полностью гарантирующих отсутствие ВИЧ, HBs-антигена или каких-либо других инфекционных агентов в биологическом материале, рекомендуется обращаться с этими реагентами как с потенциально инфекционно-опасными.

2. Азид натрия

Некоторые реагенты, входящие в состав набора, содержат азид натрия в качестве консерванта, который может взаимодействовать с некоторыми металлами (медь, латунь, свинец) с образованием взрывчатых веществ. При попадании этих реагентов на кожу смывайте их большим количеством воды.

3. Стоп раствор

Стоп раствор состоит из 1N NaOH, с которым необходимо обращаться с осторожностью. Может вызывать ожоги; использовать перчатки, защиту для глаз и защитную одежду. Избегать ингаляции. Разлитый раствор разбавить с водой перед тем, как вытереть его при помощи бумажного полотенца.

Замечания по процедуре

1. Не замораживайте реагенты. Храните все компоненты набора при температуре 2-8°C.
2. При каждой постановке используйте отрицательный и положительный контроли.
3. Наборы предназначены только для исследования сывороток крови. Гемолиз, сильная мутность и бактериальные включения влияют на результаты исследования.
4. Исследуйте сыворотки в дубликатах.
5. Не смешивайте реагенты из разных партий наборов.
6. Не пользуйтесь просроченными реагентами.
7. Не оставляйте реагенты на продолжительное время при комнатной температуре.
8. Не подвергайте раствор субстрата воздействию прямых солнечных лучей.
9. Точное дозирование необходимо для получения воспроизводимых результатов.

V. МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Материалы, входящие в состав набора

1.	PLA GAD = GAD-микролуночные полоски (с держателем)	12 штук
2.	CONJ ENZ 6X = GAD Ферментный конъюгат (конц.)	2 x 1,0 мл
3.	DIL SPE 5X = растворитель образцов Isletest (конц.)	1x25,0 мл
4.	CONJ ENZ DIL = Растворитель конъюгата Isletest (конц.)	1x10,0 мл
5.	CAL GAD CAL 1-3 = GAD – Калибраторы (1,2,3) (сыворотка человека)	1 x 1,5 мл
6.	CTRL -GAD = GAD – Отрицательный контроль (сыворотка человека)	1 x 1,5 мл
7.	CTRL +GAD = GAD – Положительный контроль (сыворотка человека)	1 x 1,5 мл
8.	SUBS PNPP = Раствор субстрата Isletest (PNPP)	1x15,0 мл
9.	BUF WASH 25X = Промывочный буфер Isletest (конц.)	1x20,0мл
10.	SOLN STP = Стоп раствор Isletest (1N NaOH)	1 x 6,0 мл

VI. Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора:

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Впитывающие бумажные салфетки для сушки полосок после мытья и парафильм/пластиковые обертки для покрытия полосок во время инкубации.
3. Стеклообразователи для разведения сывороток.
4. Микропипетки со сменными наконечниками на 10, 50 и 100 мкл.
5. Вошер - устройство для промывки планшетов (автоматическое или ручное).
6. Пипетка на 5 мл для конъюгата.
7. Градуированная лабораторная посуда, объемом 500 мл.
8. Планшетный фотометр с длиной волны 405 нм.
9. Этикетки для пометки неиспользованных лунок перед анализом.

VII. СБОР ОБРАЗЦОВ

Соберите 5-10 мл венозной крови в пробирку для сгустков (красный верх). Необходимо использовать отделители сыворотки. Отделите

сыворотку центрифугированием после формирования сгустка. Образцы сыворотки могут храниться при температуре 2-8 °С до 24 часов. Если в течение этого времени нет возможности провести исследование сыворотки, то ее необходимо заморозить (-20°C). Выраженный гемолиз, липемия, мутность и бактериальные включения могут влиять на точность результатов исследования.

VIII. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Восстановление Ферментного Конъюгата GAD:

Аккуратно перенесите 5 мл раствора для разведения конъюгата в один из двух флаконов с концентрированным раствором конъюгата, закройте флакон и осторожно перемешайте переворачиванием. Храните разведенный конъюгат при температуре 2-8°C, если он не используется. Пометить дату на этикетке. **Рабочий раствор конъюгата годен к употреблению в течение 30 дней с момента приготовления.** В состав набора входит 2 флакона с концентрированным раствором конъюгата, содержимого каждого флакона достаточно для проведения 48 определений на 6 стрипах.

2. Буфер для разведения проб Isletest:

Если в результате хранения в растворе образовался осадок, необходимо нагреть раствор на водяной бане до 37°C в течение 30 минут. Перенесите содержимое флакона (25 мл) с концентратом растворителя в 100 мл дистиллированной или деионизированной воды в подходящей ёмкости и тщательно перемешайте. Промаркируйте колбу соответствующим образом и храните разведенный буферный раствор при температуре 2-8°C. Полученный раствор можно использовать до истечения срока годности, указанного на этикетке. Важно отметить, что наличие осадка в концентрате буфера никак не влияет на точность результатов.

3. Промывочный буфер Isletest:

Вылейте содержимое флакона в 500 мл емкость (следите за переносом всех кристаллов), добавьте 480 мл дистиллированной или деионизированной воды и тщательно перемешайте. Промаркируйте емкость с буфером соответствующим образом и храните разведенный буфер при 2-8°C. Разведенный буфер годен к употреблению на протяжении всего времени использования набора.

4. Подготовка образца сыворотки:

В промаркированные соответствующим образом пробирки внесите по 1,0 мл рабочего раствора буфера для разведения проб, после чего добавьте в каждую пробирку по 10 мкл соответствующей сыворотки. Хорошо перемешайте.

IX. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

Тестовый набор содержит 12 микролуночных полосок, покрытых очищенными клетками антигенов. Количество полосок, используемых в каждом анализе, зависит от количества тестируемых образцов сыворотки. Если используются 12 полосок, то 42 образцов сыворотки могут тестироваться этим набором в дублях.

Замечание: Изменение температуры инкубации более, чем на +/-1°C может оказывать значительное влияние на достоверность получаемых результатов. Перед проведением исследования прогрейте реагенты и сыворотки до комнатной температуры (25 °C).

1. Подсчитайте количество стрипов, необходимое для настоящего исследования. Вставьте нужное количество стрипов в рамку. Остальные стрипы верните в оригинальную упаковку.
2. Сделайте необходимые пометки по размещению образцов в планшет, например, #A1, B1, C1, D1 и т.д.
3. Добавьте 100 мкл калибраторов, положительного и отрицательного контролей и разведенных образцов сыворотки в соответствующие лунки. Лунки A1 и B1 не заполнены на данном этапе и будут использоваться позже.
4. Закройте планшет парафильмом или специальной пленкой для планшетов (для предотвращения контаминации) и инкубируйте 1 час при комнатной температуре (25 +/-1°C).
5. После окончания инкубации вытряхните жидкость из лунок, промокните планшет фильтровальной бумагой и промойте планшет 3 раза по 300 мкл промывочным буфером, используя автоматическое или ручное промывочное устройство (вошер), флакон-диспенсор или автоматическую многоканальную пипетку. Избегайте воздушных пузырьков во время промывки. Высушите планшет на фильтровальной бумаге после третьей промывки.
6. Добавьте по 100 мкл Рабочего Раствора конъюгата (смотри пункт 1. в разделе «Приготовление реагентов и образцов») во все лунки за исключением лунок A1 и B1.
7. Закройте планшет парафильмом или пленкой для планшетов и инкубируйте 1 час в темноте при комнатной температуре (25 +/-1°C).

8. После окончания инкубации промойте планшет, как описано в шаге 5 данного раздела и высушите планшет на фильтровальной бумаге.
9. Внесите по 100 мкл субстратного раствора во все лунки, включая лунки A1 и B1. Вносите субстратный раствор быстро и без перерывов.
10. Закройте планшет парафильмом или пленкой для планшетов и инкубируйте 30 минут в темном месте при комнатной температуре (25 +/-1°C).
11. Через 30 минут добавьте по 50 мкл раствора для остановки реакции во все лунки планшета, вносите раствор максимально быстро.
12. Профотометрируйте планшет на планшетном фотометре при длине волны 405 нм против бланка (лунки A1 и B1).
13. Рассчитайте результаты, как показано в следующем разделе.

X. РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

При ручном подсчете, подготовить кривую зависимости от дозы на миллиметровой бумаге, отмечая каждое значение калибратора (как указано на этикетке флакона с калибратором) на оси X и соответствующее значение оптической плотности на оси Y. Определите значение GAD каждого образца пациента. Результаты рассчитываются исходя из оптической плотности как показано в примере. Возможен автоматический расчет с использованием компьютерных программ.

Интерпретация результатов:

Значение концентрации антител к GAD (Ед/мл)	Результат
< 1.0	Отрицательный
> 1.05	Положительный
1.0 – 1.05	Неопределённый (пограничная зона)

Положительный результат (>1.05) означает присутствие антител в образце, отрицательный (<1.0) означает отсутствие антител в образце. Если результат оказался неопределённым (1.0 – 1.05), образец должен исследоваться повторно. Если и повторный результат окажется в пограничной зоне, другой сывороточный образец необходимо проанализировать попозже и интерпретировать в соответствии с клиническим статусом пациента.

ПРИМЕР ДАННЫХ ISLETTEST-GAD

Секция А: Результаты калибраторов и контролей

Тип образца	ОП	Значение концентрации анти-GAD	Результат
Калибратор 1	0,346	0,613	
Калибратор 2	0,634	1,124	
Калибратор 3	1,687	2,991	
Отрицат. контроль	0,188	0,32	-
Положит. контроль	1,24	2,2	+

Замечание: не используйте представленные данные для расчёта вместо данных, полученных в лаборатории – это только пример.

Возможные результаты

Отрицательный результат ≤ 1 Ед/мл
 Положительный результат > 1,050 Ед/мл
 Неопределённый результат (пограничная зона) 1,0 – 1,05 Ед/мл

Секция В: Результаты пациентов

Тип образца	ОП	Значение концентрации анти-GAD	Результат
Образец 1	0,375	0,664	-
Образец 2	0,273	0,484	-
Образец 3	0,662	1,173	+

XI. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Результаты теста могут считаться достоверными, если выполняются следующие условия:

- Отрицательный и положительный контроль ставятся при каждом исследовании.
- Отрицательный контроль должен давать значение < 1,0 Ед/мл, а отрицательный - > 1,0 Ед/мл
- Если эти условия не выполняются, тест считается недействительным.

XII. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Перекрёстная реактивность

Не наблюдалось значительной интерференции с антиядерными антителами, антителами к ДНК и РФ. Образцы с антителами к

тиреоглобулину и тиреоидной пероксидазе показали очень малую кросс-реактивность или её отсутствие.

Воспроизводимость

Воспроизводимость данного метода оценена на образцах с анти-GAD антителами.

Воспроизводимость внутри серии:

Образец	N	Среднее	S.D.	%C.V.
1	20	0.560	0.038	5.4
2	20	1.771	0.035	4.8

Межсерийная воспроизводимость:

Образец	N	Среднее	S.D.	%C.V.
1	10	0.424	0.074	4.6
2	10	1.542	0.040	4.5

Специфичность и чувствительность

99 сывороточных образцов было протестировано в подтверждающем тесте. Для 39 из них подтверждён отрицательный результат и для оставшихся 60 подтверждён положительный результат. Результаты представлены в следующей таблице:

Общее число протестированных образцов	Общее число отрицательных образцов ¹	Общее число положительных образцов ²	Ложно-положительные ³	Ложно-отрицательные ⁴
99	34	51	5	9

(1) Отрицательные в этом методе и референсном методе.

(2) Положительные в этом методе и референсном методе

(3) Положительные в этом методе и отрицательные в референсном методе

(4) Отрицательные в этом методе и положительные в референсном методе

Достоверность: 85,8%

Специфичность: 87,1%

Чувствительность: 85,0%

Извлечение

Результаты получены на предварительно исследованных образцах с известными значениями концентрации антител к GAD.

Ожидаемая концентрация антител	Измеренная концентрация антител	Извлечение, %
3,620	3,432	94,5
1,491	1,594	106,9
0,915	0,825	90,2
1,180	1,080	91,5

XIII. ОГРАНИЧЕНИЯ И ИСТОЧНИКИ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК

1. Хотя высокая оптическая плотность в этом тесте коррелирует с высокими титрами анти-GAD антител, данная тест-система всё же представляет собой качественный тест и не предназначен для определения титра антител.

2. Возможные причины плохой воспроизводимости результатов:

- Неправильная транспортировка реагентов
- Неправильное хранение реагентов
- Неправильное приготовление реагентов
- Недостаточная промывка лунок
- Неточное дозирование
- Использование рабочего раствора субстрата после истечения срока годности и/или экспозиция его прямым солнечным светом
- Ошибки прибора (планшетный фотометр)
- Ошибки выполнения протокола



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com