

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG-АНТИТЕЛ К ТКАНЕВОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЕ

ORG 540G, Anti-Tissue-Transglutaminase IgG

Каталог. № : **ORG 540G**

Методика от **08-2012**

Количество : **96**

Производитель: **Orgentec (Германия)**



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

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА. Он разработан для количественного определения аутоантител класса IgA к тканевой трансглутаминазе.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенной тканевой трансглутаминазой. Планшет может быть разделен на 12 стрипов по 8 ячеек каждый или может быть использован сразу для 96 определений.

В ходе анализа происходят связывание присутствующих аутоантител, образование сэндвичевого комплекса и ферментная цветная реакция в следующих фазах реакции:

Калибраторы, контроли и предварительно разбавленные пробы сыворотки пациентов вносятся в микроячейки. Любые присутствующие антитела связываются с иммобилизованными в микроячейках антигенами. После 30-минутной инкубации ячейки промываются, при этом промывочный раствор удаляет несвязавшиеся компоненты сыворотки.

Раствор конъюгата анти-человеческого-IgG с пероксидазой хрена добавляется в ячейки для определения аутоантител, связанных с иммобилизованными антигенами. После 15-минутной инкубации избыток ферментного конъюгата удаляется промывочным раствором.

Раствор хромогенного субстрата, содержащий ТМБ, добавляется в ячейки. В течение 15-минутной инкубации цвет раствора становится голубым. Развитие окраски останавливается добавлением 1M соляной кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет цвет на желтый. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в образце. Необходимо считать оптическую плотность при 450 нм.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Тканевая трансглутаминаза (t-TG) представляет собой мишень для эндомизиальных антител при целиакии.

Целиакия - хроническое заболевание, поражающее и детей и взрослых, имеющих генетическую предрасположенность. Заболевание проявляется при потреблении пищи, содержащей глютен (продукты, содержащие пшеничную муку: хлеб, выпечка, макаронные изделия). Токсический агент - глиадин, спирт-растворимая фракция пшеничного белка глютена. Он вызывает повреждение слизистой тонкого кишечника, в результате чего теряются ворсинки кишечника и развивается мальабсорбция. В результате могут появиться такие симптомы, как диарея, задержка роста, рвота, апатия, потеря аппетита.

Риск интестинальной лимфомы или любых других гастроинтестинальных неоплазм повышается, если болезнь не лечить. В будущем, хроническая целиакия, даже если она не проявляется клинически, предрасполагает к аутоиммунным заболеваниям. Таким образом, скрининг популяции на присутствие IgA- и IgG-антител к t-TG кажется оправданным. Целиакия или атрофия слизистой может быть вылечена безглютеновой диетой, которая должна строго соблюдаться.

Европейское педиатрическое общество гастроэнтерологов и диетологов в 1990 г. утвердило требования к диагностическим критериям целиакии -единственный положительный результат биопсии кишечника вместе с демонстрацией, по крайней мере, двух или трех положительных результатов на следующие антитела: IgG- и IgA-антиглиадиновые антитела, IgA-антитела к эндомизию, антиретикулиновые антитела. В 1997 году было доказано, что фермент тканевая трансглутаминаза, выделенная из клеток в месте воспаления,

главный, если не единственный эндомизиальный аутоантиген при целиакии. Данный иммуноферментный метод лёгок в исполнении, неинвазивен (по сравнению с биопсией кишечника), представляет собой эффективную альтернативу иммунофлуоресцентному методу и идеален для скрининга детей или взрослых, у которых по клиническим симптомам подозревается целиакия.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенными рекомбинантными тканевыми IgG трансглутаминазы – **1 планшет**.
2. Комбинированные калибраторы А-F с антителами к tTG класса IgG в сывороточно-буферном матриксе, содержащие IgA 0; 5; 10; 25; 75 и 200 Ед/мл – **6 флаконов, 1,5 мл каждый**. Готовы к использованию.
3. Контроли антител к tTG в сывороточно-буферном матриксе (положительный и отрицательный), концентрации указаны на вкладыше к набору – **2 флакона, 1,5 мл каждый**. Готовы к использованию.
4. Буфер образцов, желтый, **концентрат** (5x) - **1 флакон, 15 мл**.
5. Раствор ферментного конъюгата (бледно красный), содержащий поликлональные анти-человеческие-IgG антитела, меченые пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**. Готовы к использованию.
6. Раствор субстрата ТМБ - **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
7. Стоп-раствор (1M HCl) – **1 флакон, 15 мл**. Готов к использованию.
8. Буферный промывочный раствор, **концентрат** - **1 флакон, 20 мл**.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный считыватель с длиной волны измерения 450 нм;
2. Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
3. Вихревой миксер;
4. Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
5. Лабораторное часовое устройство;
6. Программное обеспечение.
7. Дистиллированная или неионизированная вода;
8. Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл;
9. Пластмассовый контейнер для хранения промывочного раствора.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови стуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизованной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C.
2. Содержит ячейки микропланшета, запечатанные в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока пригодности.
4. Не поддавайте реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленные буфер образцов и моющий буфер стабильны 30 дней при хранении при 2-8°C.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно ячеек.

- Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
- Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
- Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
- Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации, может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте, тем не менее, не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Приготовление буфера образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Приготовление образца

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки калибраторов, контролей и разбавленных проб пациентов.

- Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку. Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °C). Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре. Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
- Добавьте **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и выдержите 5 минут.

Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-650 нм.

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.

	1	2	3	4	5	6
a	KA	P1	P5			
b	KA	P1	P5			
c	KB	P2	P..			
d	KB	P2	P..			
e	KC	P3				
f	KC	P3				
g	KD	P4				
h	KD	P4				

ОЦЕНКА

Данный тест считается действительным только в случае, если ОП при 450 нм для калибраторов/Контролей и результатов контролей совпадает с соответствующим диапазоном, указанным в Сертификате контроля качества, прилагаемом к набору. Если какой-либо из указанных критериев не соответствует, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественного вычисления результатов пациентов концентрация контролей может быть использована для создания калибровочной кривой. Концентрация неизвестных показателей может быть вычислена с помощью этой калибровочной кривой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Калибровка

Данная система анализа откалибрована в относительных условных единицах, поскольку для данного анализа не существует международного эталонного препарата.

Диапазон измерения

Диапазон составляет 0- 200 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение 10 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 10 Ед/мл
Положительный: ≥ 10 Ед/мл

Линейность

Три образца пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа.

Sample	Diution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E [%]
1	1:100	188.0	188.0	100
.	1:200	101.7	94.0	108
.	1:400	48.4	47.0	103
.	1:800	24.1	23.5	103
.	1:1600	10.9	11.8	93
2	1:100	196.0	196.0	100
.	1:200	97.2	98.0	99
.	1:400	49.4	49.0	101
.	1:800	24.8	24.5	101
.	1:1600	11.9	12.3	97

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила: 1 Ед/мл.

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Intra-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	22.1	3.0
2	39.9	3.8
3	69.2	4.3

Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %
1	23.3	8.1
2	40.1	4.7
3	71.3	7.0



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

Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Результаты исследований

Study population	n	n Pos	%
Coeliac disease	35	23	65.7
Normal human sera	8	8	100.0
	90	0	0.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 540G	Pos	31	0	43
	Neg	12	90	
		43	90	133

Sensitivity: 72.1 %

Specificity: 100.0 %

Overall agreement: 91.0 %

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после оценки всех клинических и лабораторных исследований. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

Выше указанные патологические и нормальные диапазоны для антител в образцах пациента следует рассматривать только в качестве рекомендаций. Каждая лаборатория должна установить свои собственные нормы, в соответствии с ISO 15189 или другие действующие правила лаборатории.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 1 Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей или образца пациентов
 - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 2 Добавить **100 мкл** ферментного конъюгата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
 - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 3 Пипетировать **100 мкл** раствора Субстрата
 - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 4 Добавить **100 мкл** Стоп раствора
 - Выдержать **5 минут**
 - Считать результат при **450 нм**