

НАБІР ІФА
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ IgG АНТИТІЛ ПРОТИ
ДЕЗАМІДОВАНИХ ГЛІАДИН-СПЕЦИФІЧНИХ
ПЕПТИДІВ (DGP)

3514, Aeskulisa DGP-G

Каталог. №: 3514

Методика від 10-10-2013

Кількість : 96

Версія 003

Виробник : AESKU. Diagnostics,
(Німеччина)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

1 Призначення

AESKULISA DGP-G є твердофазним імуноферментним аналізом з використанням синтетичних, дезамідованих, виділених з Гліадину пептидів для кількісного та якісного визначення IgG антитіл проти дезамідованих Гліадин-специфічних пептидів (DGP) в сироватці крові людини.

Аналіз є інструментом в діагностиці целиакиї (глютен-чутливої ентеропатії).

2 Клінічне застосування і принцип аналізу (Див. оригінал інструкції).

Принцип тесту

Зразки сироватки, розбавлені 1:101, інкубують в мікропланшетах з внесенням специфічного антигену. Антитіла пацієнта, якщо вони присутні в зразку, зв'язуються з антигеном. Незв'язана фракція вимивається на наступній стадії. Потім анти-людські імуноглобуліни, кон'юговані з пероксидазою хрому (кон'югат), інкубують і відбувається реакція з комплексом антиген-антитіло в зразках в мікропланшетах. Незв'язаний кон'югат вимивається на наступній стадії. Додавання ТМВ субстрату генерує ферментативну колориметричну (синій колір) реакцію, яка зупиняється розведеною кислотою (колір змінюється на жовтий). Швидкість утворення кольору від хромогену є функцією кількості кон'югату, пов'язаного з комплексом антиген-антитіло, і вона пропорційна початковій концентрації відповідних антитіл у зразку пацієнта.

3 Комплект поставки

МАЮТЬ БУТИ ВІДНОВЛЕНІ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Буфер для зразків (5x)	1 x 20 мл	Білий	Жовтий	5 x концентрований Тріс, NaCl, BSA, азид натрію < 0.1% (консервант)
Промивний буфер (50x)	1 x 20 мл	Білий	Зелений	50 x концентрований Тріс, NaCl, Твін 20, азид натрію < 0.1% (консервант)
ГОТОВІ ДО ВИКОРИСТАННЯ				
Компонент	Кількість	Колір ковпачка	Колір розчину	Опис/вміст
Негативний Контроль	1 x 1.5 мл	Зелений	Безколірний	Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (BSA), азид натрію < 0.1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 x 1.5 мл	Червоний	Жовтий	Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (BSA), азид натрію < 0.1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 x 1.5 мл	Синій	Жовтий	Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (BSA), азид натрію < 0.1% (консервант)
Калібратори	6 x 1.5	Білий	Жовтий*	Концентрація кожного

	мл			калібратора: 0, 3, 10, 30, 100, 300 Од/мл. Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (BSA), азид натрію < 0.1% (консервант)
Кон'югат, IgG	1 x 15мл	Синій	Синій	Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому, бичачий сироватковий альбумін (BSA)
Субстрат ТМВ	1 x 15мл	Чорний	Безколірний	Стабілізований ТМВ/Н ₂ O ₂
Стоп Розчин	1 x 15мл	Білий	Безколірний	1 М соляної кислоти
Мікропланшет	12 x 8-лункових смужок	--	--	Смужки, які відокремлюються Покриття див. пункт 1

* Колір збільшується з концентрацією

НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Планшетний рідер з фільтром 450 нм і опційним референтним фільтром 620 нм (600-690 нм). Скляний посуд (циліндр 100-1000 мл), пробірки для розведення. Вортекс, піпетки прецизійні (10, 100, 200, 500, 1000 мкл) або регульована мультіпіпетка (100-1000 мл). Мікропланшетний Пристрій для промивки (300 мкл повторювання або багатоканальна піпетка або автоматизована система), адсорбуючий папір.

Наші тести призначені для використання з очищеною водою відповідно до визначення Фармакопеї США (USP 26 – NF 21) та Європейської Фармакопеї (Eur.Ph. 4-е вид).

4 Зберігання та термін придатності

Зберігати всі реагенти і Мікропланшет при температурі 2-8 °C/35-46 °F, в оригінальній упаковці. Готові, відновлені розчини стабільні протягом 1 місяця при температурі 2-8 °C/35-46 °F, як мінімум. Реагенти і Мікропланшет повинні використовуватися тільки в межах терміну придатності, зазначеного на кожному компоненті. Уникайте інтенсивного впливу світла на ТМВ розчин. Зберігайте Мікропланшети в призначеній для цього фользі, в тому числі з осушувачем, і щільно закривайте.

5 Безпека використання

5.1 Небезпека для здоров'я

ЦЕЙ ПРОДУКТ ПРИЗНАЧЕНИЙ ТІЛЬКИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ІN VITRO. Таким чином, тільки персонал, навчений і спеціально інформований щодо методів діагностики в пробірці, може проводити аналіз. Хоча цей продукт не вважається особливо токсичним або небезпечним в умовах нормального використання, притримуйтесь наступних заходів для максимальної безпеки:

Рекомендації та заходи безпеки

Цей комплект містить потенційно небезпечні компоненти. Хоча реагенти не класифіковані як подразник для очей і шкіри, ми рекомендуємо уникнути контакту з очима та шкірою і носити одноразові рукавички.

УВАГА! Калібратори, Контролі та Буфери містять азид натрію (NaN₃) як консервант. NaN₃ може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN₃ може реагувати зі свинцем і міддю і формувати вибухонебезпечні азиди металів. При знищенні, змити з великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азидів. Будь ласка, зверніться до процедур дезактивації, як це викладено CDC або до інших місцевих/національних керівних принципів.

Не паліть, не їжте і не пийте під час роботи з набором. Не піпетувати ротом.

Весь вихідний людський матеріал, що використовується для деяких реагентів цього набору (контролі, стандарти, наприклад) був протестований схваленими методами, і був негативним до HbsAg, гепатиту С та ВІЛ 1. Проте, жоден тест не може гарантувати відсутність вірусних агентів у таких матеріалах повністю. Таким чином, поводитись з контролями, стандартами і зразками пацієнтів як з потенційним джерелом інфекційних захворювань і відповідно до національних вимог.

Комплект містить матеріал тваринного походження, як зазначено в таблиці змісту, поводитись відповідно до національних вимог.

5.2 Загальні зауваження щодо використання

У разі, якщо інформація про продукт, в тому числі маркування, є спотвореною або неправильною, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тест-набору.

Не змішуйте і не замінюйте реагенти або Мікропланшети з різних лотів. Це може привести до змін в результатах.

Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-32 °C/68-89.6 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої інкубаційної схеми для оптимального виконання тесту.

Інкубація: Ми рекомендуємо проводити тест при 30 °C/86 °F для автоматизованих систем.

Ніколи не піддавайте компоненти більш високій температурі, ніж 37 °C/98.6 °F.

Завжди проводити піпетування розчину субстрату тільки з новими наконечниками. Захищати цей реагент від світла. Ніколи не піпетувати кон'югат з наконечниками, які використовувались з іншими реагентами до цього.

Певний клінічний діагноз не повинен ґрунтуватися на результатах тільки проведеного тесту, але має бути зроблений лікарем після оцінки всіх клінічних та лабораторних досліджень. Діагноз повинен бути перевірений з використанням різних методів діагностики.

6 Відбір проб, Використання та Зберігання

Використовуйте переважно зразки сироватки. Забір крові повинен проводитись відповідно до державних вимог. Не використовуйте іктеричні, ліпемічні, гемолізовані або бактеріально забруднені зразки. Зразки крові повинні бути зібрані в чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації, зразки сироватки слід використовувати протягом 8 годин, зберігати щільно закритими при температурі 2-8 °C/35-46 °F до 48 годин або замороженими при -20 °C/-4 °F для більш тривалих періодів.

7 Процедура аналізу

7.1 Підготовчі заходи перед початком роботи

Розвести концентровані реагенти:

Розвести концентрований буфер для зразків 1:5 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 80 мл).

Розвести концентрований Промивний буфер 1:50 дистильованою водою (наприклад, 20 мл плюс 980 мл).

Щоб уникнути помилок ми пропонуємо позначити ковпачки різних калібраторів.

Зразки:

Розвести зразки сироватки 1:101 буфером для зразка (1x)

Наприклад, 1000 мкл буфера для зразків (1x) + 10 мкл сироватки. Добре перемішати!

Промивання:

Підготувати 20 мл розведеного промивного буфера (1x) на 8 лунок або 200 мл на 96 лунок, наприклад, 4 мл концентрату плюс 196 мл дистильованої води.

Автоматизоване промивання:

Врахувати надлишкові обсяги, необхідні для налаштування приладу, і мертві обсяги для автоматизованого піпетування.

Ручне промивання:

Видалити рідини з лунок перекиданням планшета. Постукати рамкою з мікрорунами енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожен лунку, почекати 20 секунд. Повторити всю процедуру ще два рази.

Мікропланшети:

Розрахуйте кількість лунок, необхідних для аналізу. Видалити зайві лунки з рамки, помістити в пакет і зберігати разом з осушувачем, щільно закритими (2-8 °C/35-46 °F).

7.2 Схема Піпетування

Ми пропонуємо піпетувати калібратори, контролю і зразки таким чином:

Для **КІЛЬКІСНОЇ** інтерпретації

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	



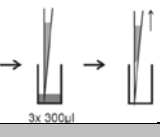


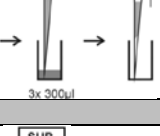




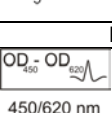
CalA: калібратор A
CalB: калібратор B
CalC: калібратор C
CalD: калібратор D
CalE: калібратор E
CalF: калібратор F

Для **ЯКІСНОЇ** інтерпретації

	1	2	3	4...
A	NC	P2		
B	NC	P2		
C	CC	P3		
D	CC	P3		
E	PC	...		
F	PC	...		
G	P1	...		
H	P1	...		

PC: позитивний контроль
NC: негативний контроль
CC: cut-off калібратор
P1: пацієнт 1
P2: пацієнт 2
P3: пацієнт 3

7.3 Проведення тестування

Крок	Опис
1.	Переконайтеся, що підготовка відповідно до пункту 7.1 вище була проведена перед піпетуванням.
2.	Використовуйте наступні кроки для отримання необхідних кількісних/якісних результатів:
КОНТРОЛІ І ЗРАЗКИ	
3.	 <p>Внести в зазначені лунки, як описано в розділі 7.2 вище, 100 мкл кожного:</p> <p>a. Калібраторів (CAL.A до CAL.F) для КІЛЬКІСНОЇ або</p> <p>b. Cut-off калібратора (CC) для ЯКІСНОЇ інтерпретації і 100 мкл кожного з наступних:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Негативного контролю (NC) і Позитивного контролю (PC), і • Розведеної сироватки пацієнта (P1, P2 ...)
4.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.</p>
5.	 <p>Промити 3 рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).</p>
КОН'ЮГАТ	
6.	 <p>Внести 100 мкл кон'югату в кожен лунку.</p>
7.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F.</p>
8.	 <p>Промити 3 рази з 300 мкл промивного буфера (розведений 1:50).</p>
СУБСТРАТ	
9.	 <p>Внести 100 мкл ТМБ субстрату в кожен лунку.</p>
10.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищений від інтенсивного світла.</p>
СТОП РОЗЧИН	
11.	 <p>Внести 100 мкл стоп-розчину в кожен лунку, використовуючи той же порядок, що і при піпетуванні субстрату.</p>
12.	 <p>Витримати 5 хвилин мінімум.</p>
13.	Ретельно струшувати пластину протягом 5 сек.
14.	 <p>Виміряти оптичну щільність при 450 нм (рекомендується 450/620 нм) протягом 30 хвилин.</p>

8 Кількісна та Якісна Інтерпретація

Для **кількісної** інтерпретації побудувати стандартну криву, відклавши **оптичну щільність (OD)** кожного калібратора (**вісь Y**) по відношенню до відповідних значень концентрації в Од/мл (**вісь X**). Для досягнення найкращих результатів ми рекомендуємо використання log/lin координат та 4-Параметрове налаштування. 3

OD кожного зразка зчитати відповідні концентрації антитіл, виражені в Од/мл.

Нормальний діапазон	Сумнівний діапазон	Позитивні результати
< 12 Од/мл	12 - 18 Од/мл	> 18 Од/мл

Приклад стандартної кривої

Не використовувати цей приклад для інтерпретації результатів пацієнтів

Калібратори IgG	OD 450/620 нм	CV % (Варіація)
0 Од/мл	0.039	0.0
3 Од/мл	0.135	1.1
10 Од/мл	0.313	3.2
30 Од/мл	0.552	3.6
100 Од/мл	1.187	3.5
300 Од/мл	2.031	3.2

Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (Од/мл)
P 01	1.017/1.029	1.023	85.6
P 02	0.498/0.494	0.496	29.4

Зразки вище значення найвищого діапазону калібратора слід представляти у вигляді > Max. Вони повинні бути розведені в міру необхідності і знову аналізовані. Зразки нижче значень діапазону калібратора повинні бути представлені у вигляді < Min.

Дані, характерні для конкретного лоту, знаходяться в листі контролю якості. Медичні лабораторії можуть проводити свій Контроль Якості використовуючи власні контролю і/або внутрішній пул сироваток, як це передбачено нормами ЄС.

Кожна лабораторія повинна встановити свої межі нормальних значень, ґрунтуючись на власних методах, контролях, обладнанні і популяції пацієнтів у відповідності зі своїми встановленими процедурами.

У випадку, коли значення контролів не відповідають критеріям, тест є недейсним і повинен бути повторений.

Наступні технічні дані повинні бути перевірені: термін придатності (приготовлених) реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, фотометр, умови інкубації і методи промивки.

Якщо протестовані зразки показують значення, які відхиляються від встановлених, або критерії перевірки не виконуються без вагомих причин, будь ласка, зверніться до виробника чи постачальника тест-набору.

Для якісної інтерпретації зчитати оптичну щільність Cut-off калібратора і зразків пацієнтів. Порівняти OD пацієнта з OD Cut-off калібратора. Для якісної інтерпретації ми рекомендуємо розглядати сироватки в діапазоні 20% навколо порогового значення, як двозначні. Всі зразки з більш високим OD вважаються позитивними, зразки з більш низькими OD вважаються негативними.

Негативний: OD пацієнта < 0.8 x OD Cut-off
Сумнівний: 0.8 x OD Cut-off ≤ OD пацієнта ≤ 1.2 x OD Cut-off
Позитивний: OD пацієнта > 1.2 x OD Cut-off

9 Технічні дані

Матеріал зразка: сироватка
 Об'єм зразка: 10 мкл зразка, розведеного 1:101 в 1х буфері для зразків

Загальний час інкубації: 90 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F

Діапазон калібрування: 0-300 Од/мл

Аналітична чутливість: 1.83 Од/мл

Діапазон значень: 2.09 – 300 Од/мл

Зберігання: при температурі 2-8 °C/35-46 °F використовуйте тільки оригінальні флакони

Кількість визначень: 96 тестів

10 Робочі характеристики

10.1 Аналітична Чутливість

Тестування буфера для зразків 62 разів на AESKULISA DGP-G дало ліміт бланка 0.3 Од/мл і 8 низьких негативних зразків 8 раз дало значення межі виявлення 1.83 Од/мл.

10.2 Порівняння методів

Мікропланшети покриті синтетичними, дезамідованими, виділеними з Гліадину пептидами. Перехресної реактивності з іншими аутоантитілами не було виявлено.

Всього 218 зразків дорослих та дітей (див. таблицю) були протестовані на AESKULISA DGP-G і заявленому пристрої, і отримані значення знаходились у вказаному діапазоні. Результати наведені в наступній таблиці (зразки поза діапазоном були виключені з порівняння, але були включені в клінічні перевірки нижче):

DGP-G	AESKU	Predicate	
Diagnosis	POS (>18)	POS	Total
CD	62 (93.9%)	59 (89.4%)	66
CD IgA Def	15 (100%)	15 (100%)	15
CD suspect	30 (81.1%)	31 (83.8%)	37
CD suspect IgA Def	0 (0%)	0 (0%)	2
DH	39 (86.7%)	38 (84.4%)	45
Controls (non-DH/CD)	3 (5.7%)	1 (1.9%)	53
Total	149 (68.3%)	144 (66.1%)	218

DGP-G		predicate		Total
		POS (>20)	NEG (≤20)	
AESKU	Pos (>18)	136	13	149
	Neg (≤18)	8	61	69
	Total	144	74	218

Positive agreement	95% C.I.	
94.44% (136/144)	89.42%	97.16%
Negative agreement		
82.43% (61/74)	72.23%	89.44%
Overall Agreement		
90.37% ((136+61)/218)	85.72%	93.61%

(*) Узгодженості були розраховані з урахуванням сумнівних результатів як негативних і низьких позитивних результатів як позитивних.

З 21 зразка з розбіжностями результатів набір AESKULISA перевершив заявлений пристрій в 11 випадках на основі додаткової інформації, такої як EMA, біопсії і результатів аналізів DGP інших класів імуноглобулінів.

10.3 Клінічна оцінка

Діагностична чутливість 93.8% і діагностична специфічність 97.3% були розраховані з використанням 254 зразків: Вищезазначені CD і DH, без DH/CD і аутоімунні зразки контролів, ігноруючи результати для підозрюваних зразків і здорових контролів (див. таблицю нижче).

DGP-G	AESKU	
Disease Group	POS (>18)	Total
Autoimmune Controls *	0(0%)	54
CD	75(94.9%)	79
CD IgA Def	16(100%)	16
DH	59(90.8%)	65
Controls (non-DH/CD)	3(5.4%)	56
Total		270

(*) Містить додаткові зразки, які аналізувались тільки на AESKULISA і не аналізувались на заявленому пристрої і зразки, які показали високу позитивність поза допустимим діапазоном.

DGP-G	Diagnosis		
Test	POS	NEG	Total
POS>18	150	3	153
NEG ≤18	10	107	117
Total	160	110	270

Diagnostic Sensitivity*	95% C.I.	
93.75% (150/160)	88.88%	96.57%
Diagnostic Specificity*		
97.27% (107/110)	92.29%	99.07%

*Сумнівні результати приймалися як негативні.

10.4 Лінійність

Обрані сироватки були протестовані за допомогою цього набору і встановлено, що вони розбавляються лінійно з негативною сироваткою відповідно до CLSI EP06-A. Тим не менш, через неоднорідність природи людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підпадають під це правило.

Composition		High			Medium			Low		
Pos. sample	Neg. sample	Mean [U/ml]	Expected [U/ml]	Recovery [%]	Mean [U/ml]	Expected [U/ml]	Recovery [%]	Mean [U/ml]	Expected [U/ml]	Recovery [%]
100.0%	0.0%	313.9	313.9	100.0%	119.2	119.2	100.0%	16.7	16.7	100.0%
87.5%	12.5%	264.1	274.7	96.1%	100.8	104.3	96.7%	15.8	14.6	108.2%
75.0%	25.0%	243.3	235.4	103.3%	91.9	89.4	102.8%	12.4	12.5	98.7%
67.5%	32.5%	199.8	211.9	94.3%	76.0	80.4	94.4%	9.8	11.3	86.5%
50.0%	50.0%	162.5	157.0	103.5%	52.6	59.6	88.2%	8.0	8.4	95.6%
37.5%	62.5%	106.4	117.7	90.4%	46.0	44.7	103.0%	6.7	6.3	107.5%
25.0%	75.0%	84.1	78.5	107.2%	24.5	29.8	82.1%	3.0	4.2	71.1%
12.5%	87.5%	42.3	39.2	107.8%	13.7	14.9	91.6%	1.2	2.1	58.0%

З врахуванням цих даних, лінійний діапазон для AESKULISA DGP-G становить від 2.09 Од/мл до 300 Од/мл.

10.5 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на п'яти відібраних зразках сироватки для представлення діапазону в порівнянні зі стандартною кривою, у 8 повторях в 5 аналізах. Варіабельність від Лоту до Лоту оцінювали вимірюванням п'яти зразків сироватки в 8 повторях з 3 різними лотами.

Inter-assay variability			Intra-assay variability			Lot-to-Lot variability		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)	Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)	Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	3.24	21.5	1	3.24	11.3	1	2.67	7.6
2	12.1	14.8	2	12.1	10.4	2	11.5	12.4
2b	19.5	10.0	2b	19.5	9.0	-	-	-
3	24.3	13.0	3	24.3	11.7	3	22.4	9.1
4	86.2	10.8	4	86.2	9.3	4	79.8	7.2
5	256.9	11.8	5	256.9	8.5	5	265.6	8.6

Критеріями прийнятності є $\leq 15\%$ для позитивних зразків, $\leq 15\%$ для сумнівних зразків і $\leq 25\%$ для негативних зразків.

10.6 Калібрування

Через відсутність референтних матеріалів аналіз калібрується в Од/мл.

10.7 Нормальний діапазон

DGP-G антитіла представлені у $> 13.7\%$ від загальної популяції.

133 випадкових донорів крові були перевірені на антитіла DGP-G. З них: 116 коливалася у віці 16-45 і 17 були 46+; вони включали однакову кількість чоловіків і жінок. Один зразок (0.8%) був позитивним зі значенням 18.2 одиниці, інші були негативними. Середнє значення зразків склало 3.2 одиниці зі стандартним відхиленням 2.2 одиниці. Середнє значення становить 6.9 стандартних відхилень нижче межі позитивності у 18 одиниць.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com