



**Набор для количественного
определения тканевых антител
трансглутаминазы IgG в человеческой
сыворотке или плазме
Transglutaminase IgG**

Кат. № : 107-K10TG
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

Методика проверена 01-2005

1. КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
(Смотр. оригинал инструкции).

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ основывается на методе иммуно-ферментного анализа (ELISA), где пероксидаза хрена используется как ферментный трейсер. В процессе первой инкубации антитела образца анти-трансглутаминазы IgG, если не другие, связываются с лунками, привитыми трансглутаминазой (человеческий рекомбинант от бакуловируса). Промывочный цикл удаляет несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (конъюгированное пероксидазой хрена) связывается с комплексом трансглутаминаза-антиген-антитело. В результате последующего промывочного цикла бесцветный раствор (ТМВ) добавляется в лунки, где формируется цветной комплекс путем реакции с ферментом пероксидазы. Образование цвета останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность цвета измеряется спектрофотометром при 450 нм, которая прямо пропорциональна концентрации антител анти-трансглутаминазы IgG, присутствующих в калибраторах, контрольной сыворотке и образцах.

**3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ:
ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ**

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8⁰С
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8⁰С в течение 1 месяца.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- 1. Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитой трансглутаминазой (человеческий рекомбинант от бакуловируса). Хранить неиспользуемые лунки при 2-8⁰С в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- 2. Калибраторы:** 5 флаконов с анти-трансглутаминазой IgG в основе сыворотки в следующих концентрациях: 0, 7, 25, 50 и 100 Е/мл. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию, красного цвета.

- 3. Контроли:** 2 флакона с анти-трансглутаминазой IgG в основе сыворотки с разными концентрациями. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию, красного цвета.
- 4. Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышинового моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с HRPO, в основе сыворотки со стабилизаторы. Консервант: тимеросал (<0.01%). Готов к использованию.
- 5. Разбавитель образца:** 1 флакон (100 мл) основы сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию.

3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для наборов следующих направлений: To.R.C.H.-S.T.D., детские, гастро-энтерологические и глютеносвязанные болезни

- 1. Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл). Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8⁰С.
- 2. Хромоген:** 1 флакон (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером и DMSO. Жидкий.
- 3. Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Жидкий.

Примечание: Чтобы получить раствор субстрата, смешайте одинаковое количество хромогена из субстратным буфером, используя темный и чистый флакон. Избегайте попадания прямого солнечного света и используйте в течение 1 часа со времени приготовления.

- 4. Стоп раствор:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готов к использованию.
- 5. Самоклеющиеся крышки для планшета**
- 6. Полиэтиленовая сумка.**

6. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

1. Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
2. Центрифуга, настроенная на 1200 об/мин..
3. Градуированные пробирки для разбавления образцов.
4. Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
5. Микропланшетный фотометр с фильтром 450, 405 и 620 нм (диапазон 0-3,0 ОП).
6. Миллиметровая графическая бумага.
7. Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

1. Данный анализ может проводиться при использовании автоматического ELISA аппарата.
2. Производитель гарантирует соответствующее использование набора с аппаратами (Radim и SEAC).

5. 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.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови, сыворотки или плазмы обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или гелевых барьеров. Дайте возможность крови сгуститься. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеточек. Образцы могут храниться при 2-8 °С на протяжении 1 недели. Если образцы не использованы на протяжении этого времени, их можно хранить при температуре -20 °С до 30 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний.

Разбавление образца

Перед анализом разбавьте образец 1:100 разбавителем образца следующим образом: **10 мкл** образца + **990 мкл** разбавителя.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- перевернув образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для бланка, контролей или калибраторов и образцов.
2. Распределите **100 мкл** контролей или калибраторов и разбавленных образцов в соответствующие лунки.
Примечание: контроли и калибраторы не должны разбавляться.
3. Внесите **100 мкл** разбавленного разбавителя образца в лунку бланка.

4. Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.**
5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленным промывочным раствором. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
6. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
7. Накройте микропланшет самоклеющейся крышкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **30+/-2 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.**
8. Промойте лунки как описано в п 5.
9. Внесите **100 мкл** предварительно приготовленного раствора субстрата (см. раздел Реагенты) во все лунки.
10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.** Избегайте попадания прямого солнечного света.
11. Добавьте **100 мкл** стоп раствора во все лунки.
12. Считайте ОП бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (настройте аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарисуйте калибровочную кривую на линейной графической бумаге, выводя концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации анти-трансглутаминазы IgG в Е/мл получаются путем интерполяции абсорбции каждого образца на калибровочной кривой.

При использовании автоматических микропланшетных аппаратов SEAC или Radim, спектрофотометрическое считывание будет проводится автоматически при 3 разных волнах: 450, 405 и 620 нм, позволяя этим расширить диапазон калибровочной кривой.

9.1 Пример вычисления

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные (см. таблицу на стр. 20 в оригинале инструкции).

Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует титр анти-трансглутаминазы IgG в 1,80 и 44,2 Е/мл.

9.2 Критерии правильности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что концентрации контролей находятся в пределах как указано в брошюре контроля качества.

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

9.5 Интерпретация результатов

Количество анти-трансглутаминазы IgG в здоровых людей (без гастроэнтерологических расстройств) на уровне ниже 7 Е/мл. Образцы с уровнем IgG равном 5-7 Е/мл должны считаться граничными, анализ которых должен подтвердиться повторно:

Нормальные значения	≤ 5 Е/мл
Граничные значения	5-7 Е/мл
Патологические значения	≥ 7 Е/мл

10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

10.1 Клиническая специфичность

Клиническая специфичность метода была оценена на группе здоровых лиц, не страдающей на колики. Результат составил **100%**.

Клиническая чувствительность была метода была оценена на соответствующей группе лиц, страдающие коликами. Результат составил **95%**.

10.3 Аналитическая специфичность

Аналитический метод не демонстрирует положительной реакции пациентов к тироидной аутоиммунной болезни.

10.3 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается в минимальной дозе, которая показывает значительное расхождение с нулевым калибратором. Проверена путем пипетирования 10 репликантов нулевого калибратора и считыванием среднего значения ОП + 2 СО, исходя из калибровочной кривой. **Доза составляет 0,24 Е/мл.**

10.4 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 3 сывороток при разных концентрациях анти-трансглутаминазы IgG.

Повторяемость (внутри анализа)

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во репликантов
A1	14,7	1,1	7,5	10
A2	33,2	1,7	5,0	10
A3	39,2	2,3	5,9	10

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A1	7,2	0,6	7,9	12
A2	12	0,9	7,8	12
A3	31,3	1,9	6,2	12

10.5 Тщательность

Тщательность была проверена анализом восстановления и путем параллельного анализа.

Анализ восстановления

Две сыворотки с известной концентрацией IgG были разбавлены 1:2 с калибраторами и проанализированы: (см. таблицу на стр. 22 в оригинале инструкции).

Параллельный анализ

Две сыворотки с известной концентрацией IgG были проанализированы при разном разбавлении с нулевым стандартом: (см. таблицу на стр. 22 в оригинале инструкции).

Информация для заказа:

10.2 Клиническая чувствительность

ЧМП «ДИАМЕБ»

ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 77 51 22;
тел./факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com