



**Набор ИФА**  
**для количественного определения антител**  
**класса IgG к ГЛИАДИНУ в человеческой**  
**сыворотке или плазме**

**Кат. №** : K9GG  
**Количество** : 96  
**Производитель** : Radim (Италия)

Методика от 05-2008

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

**ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO**

**1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ**

(См. в оригинале инструкции).

**2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Анализ основывается на методе иммуферментного анализа (ELISA), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. В процессе первой инкубации анти-глиадин IgG антитела образца, если не другие, связываются с лунками, покрытыми глиадином. Промывание удаляет несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (анти-человеческие IgG, конъюгированные пероксидазой хрена) связываются с комплексом глиадин-антиген-антитело. В результате последующего промывочного цикла бесцветный раствор хромогена (ТМВ) в субстратном буфере 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 анти-глиадин IgA антител, присутствующих в калибраторах и образцах.

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

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

**3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ**

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитым глиадином. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- **Калибраторы:** 2 набора: 4 флакона (2 мл) с анти-глиадином IgG в основе сыворотки в следующих концентрациях: 0, 50, 100 и 200 RU/мл. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Готовы к использованию, лиофилизированные и красного цвета. Разбавить 1 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течение 3 недель, при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиного моноклонального анти-человеческого IgG, конъюгированного с HRPO, в основе сыворотки со стабилизатором fvb. Консервант: неомицин. Готов к использованию, розового цвета.

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

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл). Консервант: тиомерсал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, заново восстановите раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки и стабилизаторов. Красного цвета. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 с предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить в течении 30 дней при 2-8°C.

- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цинрат-фосфатным буфером, DMSO и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Готов к использованию.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Готов к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета**
- **Полиэтиленовый пакет.**

**2. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

**4.1 Ручной анализ**

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
- Инкубатор, настроенный на 37 +/- 2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с диапазоном 0-3,0 А, способный измерять абсорбцию при 450 и 405.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

**4.2 Автоматический анализ**

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

**5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ**

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.

- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

#### Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

#### 6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Умеренно липемические или гемолизированные образцы могут повлиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разбавителя образца.

#### 7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
  - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки для бланка, калибраторов и образцов.
  2. Раскапайте **100 мкл** переработанных калибраторов и **100 мкл** разбавленных образцов в соответствующие лунки.
  3. Раскапайте **100 мкл** разбавленного разбавителя образца в лунку бланка.
  4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
  5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
  6. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
  7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
  8. Промойте лунки как описано в п 5.
  9. Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
  10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C** или **15 минут** при комнатной температуре (18-25°C). Избегайте попадания прямого солнечного света.
  11. Добавьте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
  12. Считайте ОП желательно бихроматичным спектрофотометром при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настроив

аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

\* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

#### 8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 в оригинале инструкции).

#### 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-глиаина IgG в RU/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 длиной: 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.

Описание	Абсорбция 450 нм	анти- глиадин IgG
Калибратор 0 RU/мл	0.090	
Калибратор 50 RU/мл	0.885	
Калибратор 100 RU/мл	1.484	
Калибратор 200 RU/мл	2.150	
Образец	0.835	47 RU/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует для анти-глиаина IgG титр в 47 RU/мл.

#### 9.2 Критерии правильности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
ОП кал. 200 RU/мл / ОП кал. 50 RU/мл	> 1,5
ОП кал. 50 RU/мл / ОП кал. 0 RU/мл	> 2,34

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

#### 9.3 Интерпретация результатов

Количество анти-глиаина IgG в здоровых людей (без гастроэнтерологических расстройств) отличаются от возраста. Для интерпретации результатов предлагаются следующие нормальные значение:

Возраст	
0-5 лет	≤ 60 RU/мл
> 5 лет	≤ 30 RU/мл

Значения пациентов в пределах +/- 10% от их возраста считаются сомнительными.

#### 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

##### 10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на соответствующей группе лиц без иммунитета к инфекции глиаина. Результат составил 98,8%.

##### 10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на соответствующей группе лиц, которые были инфицированы глиадином. Результат составил 92,3%.

**10.3 Точность**

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

**Повторяемость (внутри анализа)**

Сыворотка	Средн. (RU/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	16,7	0,92	5,5	14
b	72,9	4,54	6,2	14
c	163,1	8,99	5,5	14

**Воспроизводимость (между анализами)**

Сыворотка	Средн. (RU/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	18,2	1,83	10	12
b	70	5,13	7,3	12
c	168,3	12,6	7,5	12

**11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА**

Определенный диагноз глютеновой болезни может быть сделан только на основании слизистой биопсии тонкой кишки. Анализ анти-глиадин IgA и IgG антитела может указывать на этот симптом и служить направлению пациента к проведению биопсии.

Высокие титры антител анти-глиадина можно обнаружить при других гастроэнтерологических болезнях как болезнь Крона, язвенный колит и эзофагит. Низкие количества анти-глиадин IgA антител были обнаружены в некоторых случаях глютеновой болезни исходя из определенной недостаточности IgA.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: (0342) 775122; тел./факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)