

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ГЛИАДИНУ

ORG 534G, Anti-Gliadin IgG

Каталог. № : **ORG 534G**

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.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для количественного определения аутоантител класса IgG против Глиадина.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Серологический диагноз целиакии у детей и взрослых все больше и больше заменяет инвазивные методы биопсии. Целиакия, также известный как глютен-чувствительная энтеропатия - прежде всего болезнь, распространенная у детей. Она вызвана гиперчувствительной реакцией в ответ на поступление с пищей глиадина (глютена), белка, присутствующего во многих хлебных злаках. Это не IgE-опосредованная пищевая непереносимость ведет к тяжелым нарушениям всасывания и характеризуется полной атрофией ворсинок кишечника и гиперплазии крипт верхнего отдела тонкого кишечника.

Соблюдение безглютеновой диеты, то есть исключение всех продуктов, содержащих пшеницу, рожь, овес и ячмень, приводит к очень быстрому восстановлению слизистой, сопровождающемуся исчезновением мальабсорбции и сопутствующих клинических симптомов. Соответственно, пациенты, страдающие целиакией, должны придерживаться безглютеновой диеты всю оставшуюся жизнь Глиадины - белки, содержащие большие количества аминокислот пролина и глутамина. Этот белок содержится в зернах пшеницы, овса, ячменя и ржи и ответствен за хлебопекарные свойства муки. Благодаря возможности определять в сыворотке крови с высокой специфичностью и чувствительностью IgA- и IgG-антитела против глиадина можно уменьшить необходимость инвазивных процедур биопсии. В прошлом пациенты подвергались этой тяжелой процедуре несколько раз: при подозрении на целиакию, после определенного периода безглютеновой диеты, а также после теста провокации с глютенем. Было зарегистрировано, что снижение уровня антител происходит очень быстро после назначения безглютеновой диеты, и этот уровень повышается сразу после появления глютена в диете. Таким образом, серологический анализ представляет собой надежный метод контроля соблюдения безглютеновой диеты пациентами, особенно детьми и подростками.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Ячейки планшета покрыты высокоочищенным глиадином из пшеницы. 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 сэндвич комплекса и ферментная цветная реакция. 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-антител в образце.

Необходимо считать оптическую плотность при 450 нм. Рекомендуется бихроматический режим с фильтром сравнения 600 - 690 нм.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	96 тестов
Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый. Готов к использованию.	1
Калибратор А 0 Ед/мл, содержащий сывороточную/буферную матрицу (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор В 6.3 Ед/мл, содержащий антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор С 12.5 Ед/мл, содержащий антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор D 25 Ед/мл, содержащий антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор E 50 Ед/мл, содержащий антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Калибратор F 100 Ед/мл, содержащий антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтый. Готов к использованию.	1 x 1.5 мл
Контроли (Положительный и Отрицательный), содержащие антитела Глиадина в сывороточной/буферной матрице (PBS, BSA, моющее средство, NaN ₃ 0,09%), желтого цвета. Готовы к использованию. Концентрация указывается в сертификате анализа.	2 флакона 1.5 мл каждый
Буфер для образцов Р, содержит PBS, BSA, моющее средство, консервант азида натрия 0,09%, желтый, концентрат (5 х).	1 флакон 15 мл
Раствор ферментного конъюгата (светло-красный), содержащий античеловеческие антитела IgG, меченые пероксидазой хрена; содержит PBS, BSA, детергент, консервант Проклин. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Раствор субстрата ТМБ, бесцветный. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Стоп-раствор, содержит кислоту. Готов к использованию.	1 флакон 15 мл
Буферный промывочный раствор, концентрат (50x)	1 флакон 20 мл
Инструкция по применению	1 шт.
Сертификат контроля качества	1 шт.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм; опционно: контрольный фильтр с длиной волны 620 нм
 - Программное обеспечение для ридера
 - Многоканальный диспенсер или пипетка для многократного дозирования объемом 100 мкл
 - Вортексный миксер
 - Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
 - Таймер
 - Дистиллированная или деионизированная вода
 - Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
 - Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора
- Наборы ORGENTEC ИФА являются подходящими для использования на открытых автоматизированных процессорах. Каждый анализ должен быть оценен на соответствующей автоматизированной системе. Подробная информация предоставляется по запросу.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

- Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.

- Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
- Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

ХРАНИЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить набор при 2 - 8 °С
- Держать микропланшетные лунки в герметичном мешочке с осушителем.
- реагенты стабильны до окончания срока годности набора.
- Не поддавать реагенты для анализа воздействию тепла, солнца или сильного света в течении хранения и использования.
- Разбавленный буфер образца и промывочный буфер стабильны по крайней мере 30 дней при 2 - 8 °С. Рекомендуется использование в тот же день.

ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
- Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре.
- Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
- Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
- 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 микроплшета.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. 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 мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп-раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (№N3) в качестве консерванта. Он способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 8, 9, 10).
7. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
8. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
9. Не отбирайте образцы ртом.
10. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить.

11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами; повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление промывочного раствора

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

Приготовление буфера для образцов

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной или деионизированной 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. Калибраторы/Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Приготовьте достаточное количество стрипов для контролей/калибраторов и проб пациентов.

1. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую ячейку.
Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (20 - 28 °С).
Удалите содержимое ячеек и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
2. 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.
3. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую ячейку.
Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
4. 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 600-690 нм.

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

Пример пипетирования:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	P1										
B	B	P2										
C	C	P3										
D	D											
E	E											
F	F											
G	C+											
H	C-											

P1... - образцы пациентов, A-F - калибраторы, C+, C- – контроли

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.

РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для количественных результатов отложить оптическую плотность каждого калибратора согласно концентрации калибратора, чтобы построить калибровочную кривую. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена с калибровочной кривой с помощью интерполяции.

Для данного набора рекомендуется 4-параметрический с линейно-логарифмическими координатами метод для оптической плотности и концентрации.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Калибровка

Это система анализа откалибрована в относительных условных единицах, так как ни один международный контрольный препарат не доступен для данного анализа.

Диапазон измерения

Расчетный диапазон данного ИФА анализа составляет: 0-100 Ед/мл

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены с этим анализом ИФА: Пороговое значение Cut-off 12 Ед/мл

Интерпретация результатов

Отрицательный: < 12 Ед/мл
Положительный: ≥ 12 Ед/мл

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образца, чтобы продемонстрировать динамический диапазон анализа. Активность для каждого разведения была рассчитана из калибровочной кривой.

Образец	Разведение	Полученное значение, Ед/мл	Ожидаемое значение, Ед/мл	П/О, %
1	1:100	94.2	94.2	100
	1:200	48.0	47.1	102
	1:400	23.4	23.6	99
	1:800	11.4	11.8	97
	1:1600	5.5	5.9	93
2	1:100	70.8	70.8	100
	1:200	34.3	35.4	97
	1:400	17.2	17.7	97
	1:800	9.1	8.9	102
	1:1600	4.2	4.4	95

Предел обнаружения

Функциональная чувствительность составила: 0.5 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.

Внутри анализа		
Образец	Среднее значение Ед/мл	CV [%]
1	12.8	2.1
2	31.5	4.7
3	57.8	2.2

Между анализами		
Образец	Среднее значение Ед/мл	CV [%]
1	12.3	5.4
2	32.4	4.4
3	74.9	2.5

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	40	37	92.5
Normal human sera	50	1	2.0

		Clinical Diagnosis		
		Pos	Neg	
ORG 534G	Pos	37	1	
	Neg	3	49	
		40	50	90
Sensitivity:		92.5 %		
Specificity:		98.0 %		
Overall agreement:		95.6 %		

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 всех 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. Добавить **100 мкл** калибратор, контроль или образец пациента
→ Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
2. Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
→ Удалить содержимое ячеек и **трижды** промыть **300 мкл** промывочного раствора
3. Добавить **100 мкл** раствора субстрата
→ Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
4. Добавить **100 мкл** стоп раствора
→ Выдержать **5 минут**
→ Считать при 450 нм



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