

НАБОР ИФА

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG И IgA АНТИТЕЛ К ТКАНЕВОЙ ТРАНСГЛУТАМИНАЗЕ

ORG 540S, Anti-Tissue-Transglutaminase Screen

Каталог. № : **ORG 540S**

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

Данный набор Anti-tissue Transglutaminase Screen (анти-тканевая трансглутаминаза Скрин) основан на непрямом твердофазном иммуноферментном методе (ELISA) и предназначен для одновременного количественного измерения IgG и IgA классов аутоантител к тканевой трансглутаминазе (tTG) в сыворотке или плазме человека. Метод предназначен только для *in vitro* диагностики и может быть использован при диагностике целиакии и герпетиформного дерматита.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Впервые целиакия была описана Dr. Samuel Gee в 1888 году. Он отмечал недостаточный рост, патологический стул и вздутие живота как общие признаки болезни у детей. В 1950 годы, с появлением возможности проводить перорально биопсию слизистой, выявлены типичные аномалии слизистой тонкой кишки у пациентов с целиакией. У пациентов, страдающих этим заболеванием, наблюдается атрофия слизистой оболочки с резким укорочением ворсинок и гипертрофией крипт [1]. Больные целиакией могут страдать от диареи, различных желудочно-кишечных проблем, анемии, утомляемости, психиатрических расстройств, или заболевание может протекать бессимптомно. Клинические данные и исследование слизистой после установления безглютеновой диеты являются объективными признаками того, что энтеропатия индуцирована глутеном [2].

Диагностика целиакии основывается на обнаружении патологических изменений в тонком кишечнике при биопсии и позднее верифицируется с помощью безглютеновой диеты, то есть исключением из питания пшеницы, ячменя, ржи, овса и продуктов, содержащих их компоненты. Приблизительно 10% пациентов, особенно взрослых, для восстановления слизистой необходимы кортикостероиды в дополнение к исключению глютена из рациона. При отсутствии лечения у пациентов, страдающих целиакией, повышен риск развития лимфом или злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта. Более того, даже при отсутствии клинических проявлений, нелеченная на протяжении длительного периода целиакия вызывает предрасположенность к другим аутоиммунным заболеваниям, таким как сахарный диабет, ревматоидные заболевания, аутоиммунный гепатит или тиреозит. Повышенная ассоциация целиакии с селективным IgA дефицитом является потенциальной причиной ложноотрицательных результатов анализа IgA. Таким образом, если предполагается целиакия, рекомендуется проводить тестирование аутоантител класса IgG.

Было показано, что фермент тканевая трансглутаминаза (tTG) является основной, если не единственной, мишенью для эндомизиальных антител. Уровень этих антител падает при соблюдении безглютеновой диеты, облегчая этим контроль соблюдения диеты. Анти-tTG IgA являются очень чувствительным маркером целиакии 95-100 % при специфичности 90-97 % [3, 4, 5, 6].

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ячейки планшета покрыты рекомбинантной тканевой трансглутаминазой. Антитела к этому антигену, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются в лунках. При промывке ячеек удаляются все несвязавшиеся антитела. Пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная с антителами к IgG и IgA человека иммунологически связывается с аутоантителами пациентов, образуя комплекс конъюгат/антите л о/антиген. При промывке ячеек удаляется весь не связавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием голубого окрашивания. Развитие окраски останавливается добавлением кислоты в качестве стоп-раствора. Раствор меняет

цвет на желтый. Интенсивность этого желтого окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG и IgA антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
 2. Не смешивайте 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 сыворотки 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 (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.
 7. 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.
 8. Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
 9. Не пипетируйте ртом.
 10. Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
 11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.
- Следуйте указаниям для проведения контроля качества в мед. Лаборатории тестированием контролей и/или объединенной сыворотки. Во время обращения с реагентами набора, контролями и сывороткой следуйте правилам безопасности.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 ячеек каждый, покрытых рекомбинантной тканевой трансглутаминазой – **1 планшет**.
2. Комбинированные калибраторы с антителами к tTG класса IgG в сывороточно-буферном матриксе, содержащие IgG и 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**. Готов 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

Оборудование

- ✓ Микропланшетный считыватель с длиной волны измерения 450 нм;
- ✓ Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
- ✓ Вихревой миксер;
- ✓ Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
- ✓ Лабораторное часовое устройство;
- ✓ Программное обеспечение.
- ✓ Дистиллированная или неионизированная вода;
- ✓ Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл;
- ✓ 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 стечь и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. 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 стабилен 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.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно ячейки микропланшета.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера образцов

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

Приготовление промывочного раствора

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

1. 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.
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 600-650 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				

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест пригоден, если ОП при 450 нм для положительного (1) и отрицательного контроля (2) и калибраторов A-F соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, что поставляется вместе с набором. Если критерии не соответствуют, результаты не пригодны, и тест необходимо повторить

Расчет результатов

Для расчета результатов данного теста рекомендуется построение 4-параметрической кривой для оптической плотности и концентрации в линейно-логарифмических координатах. Также возможно использование логарифмических координат и сглаженной аппроксимации сплайнами.

Рекомендуемый график в линейно-логарифмических координатах

Рассчитайте среднюю оптическую плотность каждого калибратора по результатам измерения в дублях и на линейно-логарифмической бумаге отложите рассчитанные оптические плотности стандартов по оси Y, а соответствующие им значения концентрации стандартов - по оси X. Проведите оптимальную аппроксимирующую кривую между точками на графике либо просто соедините точки прямыми линиями. По построенной таким образом калибровочной кривой определите концентрации исследуемых аутоантител в образцах пациентов.

Пример вычисления

Пример вычисления результатов см. в оригинале инструкции на англ. языке. В этой табл. показаны типичные данные, которые даны только для иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления результатов пациентов.

Calibrators									
No.	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	ded. Conc.	CV%
STA	A1/B1	0.017	0.018	0.018	0.001	0.001	0	0	4.0
STB	C1/D1	0.166	0.156	1.161	5.3	4.9	5.1	5	4.4
STC	E1/F1	0.272	0.299	0.285	9.6	10.8	10.2	10	6.7
STD	G1/H1	0.645	0.614	0.630	27.1	25.5	26.3	25	3.5
STE	A2/B2	1.314	1.393	1.354	69.0	75.1	72.1	75	4.1
STF	C2/D2	2.481	2.437	2.487	201.9	203.8	202.8	200	1.3

Интерпретация результатов

При изучении нормального диапазона использовались сыворотки здоровых пациентов, и был установлен следующий диапазон значений для теста анти-Тканевая Трансглутаминаза Screen:

Anti-Tissue-Transglutaminase Screen

normal: < 15
positive: ≥ 15

Положительные результаты должны быть выверены в соответствии с полной клинической картиной пациента. Также каждое терапевтическое решение должно быть принято индивидуально. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных и патологических значений анти-Тканевая Трансглутаминаза

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Параллелизм

В экспериментах по разбавлению пробы сыворотки с высокими концентрациями IgA и IgG антител были разбавлены буфером для образцов и проанализированы.



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

Sample	Dilution	Observed U/ml	Expected U/ml	O/E [%]
1	1:100	195.7	195.7	100
-	1:200	99.4	97.9	102
-	1:400	47.3	48.9	97
-	1:800	23.1	24.5	94
-	1:1600	11.4	12.2	93
2	1:100	120.1	120.1	100
-	1:200	58.6	60.1	98
-	1:400	31.4	30.0	105
-	1:800	16.6	15.0	111
-	1:1600	7.0	7.5	93

Воспроизводимость

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из 3 образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась из результатов 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean U/ml	CV %	Sample	Mean U/ml	CV %
1	19.3	2.7	1	19.7	10.3
2	35.8	6.0	2	38.9	3.2
3	69.3	7.7	3	74.8	2.7
4	137.9	6.1	4	142.8	4.0

Чувствительность

Нижняя граница определения для антител к тканевой трансглутаминазе класса IgA и IgG - 1,0 Ед/мл.

Специфичность

Микропланшет покрыт рекомбинантной тканевой трансглутаминазой. Данный набор специфичен для аутоантител к тканевой трансглутаминазе.

Калибровка

До тех пор, пока не появится международный референс-стандарт для антител к тканевой трансглутаминазе, аналитическая система калибруется в относительных условных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Данный набор является диагностическим. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не влияет гемолизированная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияние при использовании антикоагулянтов. Но рекомендуется не использовать сильно гемолизированную или липемическую сыворотку.

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**