

**НАБІР ІФА  
ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ТА ЯКІСНОГО  
ВИЗНАЧЕННЯ IgA АНТИТІЛ ПРОТИ НЕО-  
ЕПІТОПІВ ТТГ**

**3503, Aeskulisa tTg-A New Generation**

Каталог. №: 3503

Методика від 10-10-2013

Кількість : 96

Версія 004

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 співпасти.

**1 Призначення**

**AESKULISA tTg-A New Generation** є твердофазним імуноферментним аналізом для кількісного та якісного визначення IgA антитіл проти нео-епітопів тканини трансглутамінази (ТТГ) в сироватці крові людини. Аналіз використовує рекомбінантну трансглутаміназу людини, пов'язану з гліадин-специфічними пептидами з відображенням нео-епітопів ТТГ, що забезпечує значно підвищену чутливість та специфічність тесту. Аналіз є інструментом в діагностиці та моніторингу целиакиї (глутен-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 (БСА), азид натрію < 0.1% (консервант)
Позитивний Контроль	1 x 1.5 мл	Червоний	Жовтий	Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (БСА), азид натрію < 0.1% (консервант)
Калібратор Cut-off	1 x 1.5 мл	Синій	Жовтий	Людська сироватка (розведена), бичачий сироватковий альбумін (БСА), 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 (БСА), азид натрію < 0.1% (консервант)
Кон'югат, IgA	1 x 15мл	Червоний	Червоний	Містить: Анти-імуноглобуліни людини, кон'юговані з пероксидазою хрому, бичачий сироватковий альбумін (БСА)
Субстрат ТМВ	1 x 15мл	Чорний	Безколірний	Стабілізований ТМВ/Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
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 мультипіпетка (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, притримуйтеся 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 (NaN<sub>3</sub>) як консервант. NaN<sub>3</sub> може бути токсичним, якщо його проковтнути або при попаданні на шкіру і очі. NaN<sub>3</sub> 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 негайно, 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 мікролунками енергійно на чистий адсорбуючий папір. Внести 300 мкл розведеного промивного буфера в кожну 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, контролі і зразки таким чином:

Для **КІЛЬКІСНОЇ** інтерпретації

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



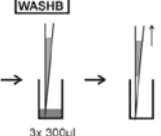


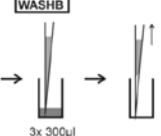




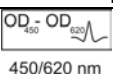
CalA: калібратор A  
CalB: калібратор B  
CalC: калібратор C  
CalD: калібратор D  
CalE: калібратор E  
CalF: калібратор F

Для **ЯКІСНОЇ** інтерпретації

	1	2	3	4...
<b>A</b>	NC	P2		
<b>B</b>	NC	P2		
<b>C</b>	CC	P3		
<b>D</b>	CC	P3		
<b>E</b>	PC	...		
<b>F</b>	PC	...		
<b>G</b>	P1	...		
<b>H</b>	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:
<b>КОНТРОЛІ І ЗРАЗКИ</b>	
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 <b>КІЛЬКІСНОЇ</b> або</p> <p>b. Cut-off калібратора (CC) для <b>ЯКІСНОЇ</b> інтерпретації і 100 мкл кожного з наступних:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Негативного контролю (NC) і Позитивного контролю (PC), і</li> <li>Розведеної сироватки пацієнта (P1, P2 ...)</li> </ul>
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>
<b>КОН'ЮГАТ</b>	
6.	 <p>Внести 100 мкл кон'югату в кожну 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>
<b>СУБСТРАТ</b>	
9.	 <p>Внести 100 мкл ТМБ субстрату в кожну лунку.</p>
10.	 <p>Інкубувати протягом 30 хвилин при 20-32 °C/68-89.6 °F, захищений від інтенсивного світла.</p>
<b>СТОП РОЗЧИН</b>	
11.	 <p>Внести 100 мкл стоп-розчину в кожну 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/lip координат та 4-Параметрове налаштування. З 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 IgA	OD 450/620 нм	CV % (Варіація)
0 Од/мл	0.073	3.1
3 Од/мл	0.179	2.3
10 Од/мл	0.342	1.2
30 Од/мл	0.662	0.1
100 Од/мл	1.310	0.9
300 Од/мл	2.263	0.3

#### Приклад розрахунку

Пацієнт	Дублікат (OD)	Середнє (OD)	Результат (Од/мл)
P 01	0.808/0.831	0.820	39.6
P 02	1.081/1.071	1.076	66.1

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 контролі 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 недійсним 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 1x буфері для зразків

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

Діапазон калібрування: 0-300 Од/мл

Аналітична чутливість: 1.0 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 30 разів на AESKULISA tTg-A New Generation дало аналітичну чутливість 1.0 Од/мл.

##### 10.2 Специфічність і чутливість

Мікропланшети покриті рекомбінантною людською тканинною трансглутаміназою і гліадин-специфічними пептидами. Перехресної реактивності з іншими аутоантигенами не було виявлено. Щоб перевірити перехресну реактивність з гліадином, 7 позитивних сироваток на гліадин були тестовані і не вступали в реакцію з цим аналізом, хоча результат може бути інакшим для інших гліадин позитивних сироваток.

Для визначення чутливості і специфічності сироватки 165 пацієнтів, які страждають на целиацію (n = 102) і пов'язаних з нею захворювань (див. таблицю нижче), були оцінені на AESKULISA і заявленому пристрої. Результати показані в таблиці нижче.

		diagnosis		
		Pos	Neg	Total
AESKULISA tTg-A	Pos	62	5	67
	Neg	2	96	98
	Total	64	101	165

Узгодженість\*: 95.8%

Чутливість\*: 96.9%

Специфічність\*: 95.0%

		Predicate device		
		Pos	Neg	Total
AESKULISA tTg-A	Pos	25	42	67
	Neg	2	96	98
	Total	27	138	165

Відносна Узгодженість: 73.3%

Відносна Чутливість: 92.6%

Відносна Специфічність: 69.6%

Disease	# Tested	# positive AESKU	# positive pred dev
Celiac Disease	64 / 64	62 (96.9)	21 (32.8)
Celiac Disease (gluten free diet)	38 / 38	0 (0.0)	1 (2.6)
Disease control (total)	70 / 210	5 (2.4)	5 (7.1)
Crohns Disease	51 / 51	1 (2.0)	0 (0.0)
Crohns Disease	0 / 58	0 (0.0)	n / d
Ulcerative Colitis	4 / 4	0 (0.0)	1 (25.0)
Ulcerative Colitis	0 / 2	0 (0.0)	n / d
Helminthiasis	2 / 2	2 (100.0)	2 (100.0)
Lactose Intolerance	2 / 2	2 (100.0)	2 (100.0)
Gladiin positive sera	0 / 7	0 (0.0)	n / d
Healthy donors	4 / 4	0 (0.0)	0 (0.0)
Healthy donors	0 / 80	0 (0.0)	n / d

#### 10.3 Лінійність

Обрані сироватки були протестовані за допомогою цього набору і встановлено, що вони розбавляються лінійно. Тим не менш, через неоднорідність природи людських аутоантитіл можуть існувати зразки, що не підпадають під це правило.

№ Зразка	Фактор розведення	Виміряна концентрація Од/мл	Очікувана концентрація Од/мл	Відновлення (%)
1	1/100	76.5	71.0	107.7
	1/200	36.6	35.5	103.1
	1/400	17.2	17.8	96.8
	1/800	8.5	8.9	95.8
2	1/100	62.2	59.0	105.4
	1/200	29.7	29.5	100.7
	1/400	13.3	14.8	90.2
	1/800	7.0	7.4	94.9

#### 10.4 Точність

Для визначення точності аналізу, мінливість (всередині і між серіями) оцінювали шляхом аналізу його відтворюваності на трьох відібраних зразках сироватки, щоб представити діапазон в порівнянні зі стандартною кривою (n=18). Прийнятний діапазон для CV становить 10% (n=24/18).

Intra-assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	13.8	7.0
2	56.7	5.2
3	166.5	5.5

Inter-assay		
Sample No.	Mean (U/ml)	CV (%)
1	10.1	2.3
2	38.9	0.8
3	169.4	4.2

#### 10.5 Калібрування

Через відсутність референтних матеріалів аналіз калібрується в Од/мл.



**ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

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