

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ГЛИАДИНУ

## 1021-2, Gliadin IgG

Каталог. № : 1021-2  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 15-09-2008



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### ПРИНЦИП ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Данный набор предназначен для определения антител класса IgG к глиадину в человеческой сыворотке. Процедура анализа включает три инкубационных этапа:

1. Сыворотки для анализа (соответствующим образом разбавлены) инкубируются в микролунках, предварительно покрытых глиадином. Любое антиген специфичное антитело в образце связывается с зафиксированным антигеном. Для удаления несвязанного антитела и других компонентов сыворотки планшет промывается.
2. Анти-человеческий козий IgG (специфическая  $\gamma$ -цепочка), конъюгированный пероксидазой хрена, добавляется в лунки и планшет инкубируется. Конъюгат реагирует с антителом глиадина, зафиксированном в твердой фазе в этапе 1. Для удаления не вступившего в реакцию конъюгата промываются лунки.
3. Микролунки, содержащие зафиксированный конъюгат пероксидазы, инкубируются с раствором субстрата пероксидазы. Гидролиз субстрата пероксидазой производит изменение цвета. После определенного времени реакция останавливается и интенсивность цвета раствора измеряется фотометрически. Интенсивность цвета раствора зависит от концентрации антитела в анализируемом образце.

### СБОР ОБРАЗЦОВ

В данном анализе должны использоваться только недавно собранные и должным образом хранящиеся сыворотки крови, полученные одобренными асептическими процедурами венопункции. Никакие противосвертывающие средства или консерванты не должны быть добавлены. Избегайте использования гемолизированных, липемических или бактериологически загрязненных сывороток.

Храните образец при комнатной температуре не более чем 8 часов. Если анализ не проводится в пределах 8 часов, сыворотки могут храниться при 2-10°C не более 48 часов. Если ожидается задержка в анализе, храните анализируемые сыворотки при -20°C или ниже. Избегайте многократных циклов замораживания / размораживания, которые могут вызывать потерю активности антител и давать ошибочные результаты.

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Микропланшетный считыватель с длиной волны измерения 450 нм;
- Микропипетки для дозирования на 10 и 200 мкл;
- Регулируемая многоканальная пипетка (50-200 мкл) для распределения конъюгата. Субстрата и стоп раствора.
- Резервуары реагентов для многоканальных пипеток.
- Промывочная бутылка или система промывки планшета.
- Дистиллированная или деионизированная вода.
- Мерный цилиндр 1 л.
- Серологические пипетки: 1, 10 или 25 мл.
- Одноразовые наконечники для пипеток.
- Бумажные полотенца.
- Таймер с точностью сигнала +/- 1 сек.
- Контейнер для отходов и дезинфицирующее средство (Наприм.: 0,5% гипохлорит натрия. 10% бытовой отбеливатель).

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Каждый набор содержит в достаточном количестве последующие компоненты для проведения указанного на этикетке упаковки количества анализов.

1. Планшет. 96 лунок, расположенных в 12 полосках по 8 лунок в каждой, покрытых антигеном глиадина. Полоски с рамкой запечатаны в пакете с осушителем.
2. Конъюгат. Конъюгированный (пероксидазой хрена) козий античеловеческий IgG ( $\gamma$ -цепь специфичный). Готовый к использованию. 1 фл/15 мл с белой крышкой. Добавлен консервант.
3. Положительный контроль человеческой сыворотки. 1 фл/0,35 мл, с красной крышкой. Добавлен консервант.
4. Калибратор человеческой сыворотки. 1 фл/0,5 мл с синей крышкой. Добавлен консервант.
5. Отрицательный контроль человеческой сыворотки. 1 фл/0,35 мл с зеленой крышкой. Добавлен консервант.
6. Разбавитель образца. Одна бутылка на 30 мл (зеленая крышка), содержащая Твин-20, альбумин бычьей сыворотки и фосфат-буферный солевой раствор (рН 7,2 +/-0,2). Зеленый раствор. Готовый к использованию. **Примечание:** перед использованием хорошо взболтать.
7. ТМВ. Одна 15 мл бутылка, содержащая 3,3 '%, 5,5 '%-тетраметилбензидин (ТМВ). Готовый к использованию. Содержит DMSO  $\leq$  15% (w).
8. Стоп раствор. Один флакон, содержащий 15 мл 1.0M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.7M HCl. Готовый к использованию.
9. Концентрат промывочного буфера (10x): разбавить 1 часть концентрата + 9 частей деионизированной или дистиллированной воды. Одна 100 мл бутылка (прозрачная крышка), содержащая концентрат 10x фосфат-буферного солевого раствора и Твин-20 (синий раствор). **Примечание:** 1X раствор, имеющий рН 7.2 +/- 0.2.

Следующие компоненты не зависят от номера партии и могут использоваться взаимозаменяемо в ИФА: ТМВ, стоп раствор, и промывочный буфер.

### Примечание: Набор также содержит:

1. Перечень компонентов внутри упаковки набора с указанием информации по их партии.
2. Вкладыш с инструкциями по пользованию.

### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Храните невскрытый набор при 2-8°C.
2. Микролуночные полоски, покрытые глиадином: лишние полоски должны быть немедленно запечатаны с осушителем и возвращены для хранения при 2-8°C. Полоски стабильны в течение 60 дней после вскрытия пакета и пр. правильном его закрытии, и если индикатор остается синим.
3. Конъюгат. Хранить при 2-8°C. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.
4. Калибратор и контроли человеческих сывороток: Хранить при 2-8°C.
5. ТМВ: Хранить при 2-8°C.
6. Концентрат промывочного буфера: Хранить при 2-25°C. Стабилен в течение 30 дней при 2-8°C после разбавления 1X, или 7 дней во время хранения при комнатной температуре.
7. Разбавитель образца: Хранить при 2-8°C.
8. Стоп раствор: Хранить при 2-25°C.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Во время каждого анализа положительный калибратор должен анализироваться в трех экземплярах. Положительный и отрицательный контроли, бланк реагент должны также быть включены в каждый анализ.
2. Вычислите среднее из трех положительных определений калибратора. Если любое из трех положительных значений калибратора отличается больше чем на 15% от среднего, не принимайте во внимание это значение и вычислите среднее остальных двух значений.
3. Среднее значение ОП для калибратора и значений ОП для положительного и отрицательного контролей должно находиться в пределах следующих диапазонов:

#### ДИАПАЗОН ОП

Отрицательный контроль	$\leq$ 0.250
Калибратор	$\geq$ 0.300
Положительный контроль	$\geq$ 0.500

- a. ОП отрицательного контроля, разделенная на среднюю ОП калибратора должна быть  $\leq$  0.9.
  - b. ОП положительного контроля, разделенная на среднюю ОП калибратора должна быть  $\geq$  1.25.
  - c. Если значения контролей вне пределов вышеуказанных диапазонов, анализ должен рассматриваться как недействительный и должен быть повторен.
4. Положительный контроль предназначен для контроля существенной неработоспособности реагента и не гарантирует точности в пределах обнаружения анализа.

- Дополнительные контроли могут анализироваться согласно рекомендациям или требованиям местных, государственных и/или федеральных инструкций или аккредитованных организаций.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Извлеките отдельные компоненты набора, и позвольте им нагреться до комнатной температуры (20-25°C).
- Определите требуемое количество микролунок. Проведите 6 определенных контролей/калибраторов (1 бланка, 1 отриц. контроля, 3 калибраторов и 1 полож. контроля) в процедуре. Бланк реагент должен анализироваться в каждой процедуре. Для правильности настройки конфигурации контролей/калибратора проверьте ПО и требования к считывателю. Ненужные для анализа полоски необходимо положить в запечатывающийся мешочек, герметично закрыть и вернуть на хранение при 2-8°C.

ПРИМЕР СХЕМЫ ПЛАНШЕТА		
	1	2
A	Бланк	Пациент 3
B	Отриц. контроль	Пациент 4
C	Калибратор	и т.д
D	Калибратор	
E	Калибратор	
F	Полож. контроль	
G	Пациент 1	
H	Пациент 2	

- Приготовить 1:21 разбавление (напр.: 10 мкл сыворотки + 200 мкл разбавителя образца). Примечание: хорошо встряхните перед использованием положительного и отрицательного контролей, положительного калибратора и каждой сыворотки пациента.
- Добавьте по 100 мкл каждого разбавленного контроля, калибратора и образца. Убедитесь, что образцы должным образом перемешаны. Для каждого образца используйте отдельный наконечник.
- Добавьте 100 мкл разбавителя образца в лунку A1 как бланк реагент. Для правильности настройки конфигурации лунки бланк реагента проверьте ПО и требования к считывателю.
- Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 25 +/- 5 минут.
- Промойте микролуночные полоски 5х.

#### А. Ручная процедура промывки

- Энергично встряхните жидкость из лунок.
- Заполните каждую лунку промывочным буфером. Удостоверитесь в отсутствии в лунках воздушных пузырьков.
- Повторите этап а. и б., чтобы в сумме было пять промывок.
- Встряхните промывочный раствор из всех лунок. Переверните планшет на бумажное полотенце жестко постучите, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора. Осмотрите планшет, убедившись в отсутствии остатка промывочного раствора. В конце каждого рабочего дня собирайте промывочный раствор в контейнер для отходов, и обрабатывайте гипохлоритом натрия 0.5% (10% бытовым отбеливателем).

#### В. Автоматизированная процедура промывки

- При использовании автоматизированной моечной установки, отрегулируйте объем распределения на 300-350 мкл/лунку. Настройте цикл промывки на 5 промывок без задержки между промывками. Извлеките микротитровальный планшет из промывателя, переверните планшет на бумажное полотенце и жестко постучит, чтобы удалить из лунок любой остаток промывочного раствора.
- Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку в том же темпе и порядке что и образцы, включая лунку бланк реагента.
  - Инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C) в течении 25 +/- 5 минут.
  - Промойте микролунок, следуя процедуре в п. 7.
  - Добавьте 100 мкл ТМБ раствора субстрата в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялись образцы.
  - Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 10-15 минут.
  - Добавьте 50 мкл стоп раствора в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялся ТМБ раствор. Положительные образцы из синего цвета станут желтыми. После добавления стоп

раствора постучите по планшету несколько раз убедившись, что образцы полностью смешаны.

- Настройте считывающее устройство для считывания при длине волны 450 нм и измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки против бланк реагента. Планшет необходимо считать в пределах 30 минут после добавления стоп раствора.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### А. Вычисления

##### 1. Коэффициент коррекции

Значение предела обнаружения ОП для положительных образцов было определено производителем и скорректировано по отношению к калибратору. Коэффициент коррекции (КК) дает возможность определить значение предела обнаружения для положительных образцов и исправить незначительные ежедневные отклонения в результатах анализа. КК определяется для каждой партии компонентов наборов и указывается в в перечне компонентов, поставляемом в упаковке набора.

##### 2. Значение предела обнаружения ОП

Для получения значения предела обнаружения ОП умножьте КК на среднее ОП калибратора, определенное выше.

$(КК \times \text{среднее калибратора} = \text{значение предела обнаружения ОП})$

##### 3. Коэффициенты значений или коэффициенты ОП

Вычислите коэффициент значения или коэффициент ОП для каждого образца путем разделения его значения ОП на предел обнаружения ОП из этапа 2.

##### Пример:

Среднее ОП калибратора = 0,793  
 Коэффициент коррекции (КК) = 0,25  
 ОП предела обнаружения =  $0,793 \times 0,25 = 0,198$   
 ОП неизвестного образца = 0,432  
 Коэффициент значения образца или коэффициент ОП =  $0,432/0,198 = 2,18$

##### В. Интерпретация

Коэффициенты значений или коэффициенты ОП представлены следующим образом: изготовитель установил следующие рекомендации для интерпретации образцов пациентов:

Отрицательные образцы  $\leq 0,90$   
 Сомнительные образцы 0,91-1,09  
 Положительные образцы  $\geq 1,10$

#### ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- 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.
- Стой 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.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Диагноз не должен делаться только на основании данного набора. Результаты по глицерину должны интерпретироваться вместе с клинической оценкой и результатами другой диагностической процедуры.

2. Ошибочные положительные результаты могут происходить как следствие других желудочно-кишечных расстройств, как болезнь Крона и пищевая непереносимость белка, могут стимулировать выработку антител к глиадину.
3. Клиническое значение любого результата анализа зависит от его отношения к другим медицинским данным пациента. Диагностика болезни и борьба с ней должны основываться на оценке всей соответствующей информации о пациенте.
4. Педиатрические значения не были установлены с помощью этого анализа.
5. Глиадин IgG отрицательный результат в пациенте, не исключает целиакию, что связано с высокими уровнями антител глиадина IgG. Обнаружение можно часто объяснить выборочной недостаточностью IgG, при глютеновой болезни обнаружение случается относительно часто.



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)