

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgA К ГЛИАДИНУ

1022-2, Gliadin IgA ELISA

Каталог. № : 1022-2
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.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для качественного и полуколичественного определения антител класса IgA к глиадину в человеческой сыворотке. Набор предназначен для использования в качестве средства диагностики кишечно-желудочных расстройств, в основном глютеновой болезни. Анализ предназначен только для диагностического применения *in vitro*.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

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

1. Сыворотки для анализа (соответствующим образом разбавлены) инкубируются в микролунках, предварительно покрытых глиадином. Анти-глиадин специфичные IgA антитела образца связываются с зафиксированным антигеном. Для удаления несвязанного антитела и других компонентов сыворотки.
2. Анти-человеческий козлий IgA, конъюгированный пероксидазой хрена, добавляется в лунки и планшет инкубируется.
3. Лунки на микротитровальном планшете, 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.

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

Реагенты

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 полосок по 8 ячеек каждый, покрытый глиадином (антигеном). Полоски с рамкой запечатаны в пакете с осушителем.
2. Конъюгат. Анти-человеческий козлий IgA, конъюгированный пероксидазой хрена. Готовый к использованию. 1 фл/15 мл.
3. Положительный контроль человеческой сыворотки.
4. 1 фл/0,35 мл, красная крышка.
5. Положительный калибратор человека. 1 фл/0,5 мл, синяя крышка.
6. Отрицательный контроль человеческой сыворотки.
7. 1 фл/0,35 мл, зеленая крышка.
8. Разбавитель образца. Одна бутылка на 30 мл (зеленая крышка), содержащая Твин-20, альбумин бычьей сыворотки и фосфат-буферный солевой раствор (pH 7,2 +/-0,2). Готовый к использованию.
9. ТМВ. Одна 12 мл бутылка, содержащая 3,3', 5,5' - тетраметилбензидин (ТМВ). Готовый к использованию.
10. Стоп раствор. Один флакон, содержащий 15 мл 1.0M H₂SO₄, 0.7M HCl. Готовый к использованию. (Прозрачный раствор с красной крышкой).
11. Концентрат промывочного буфера. Одна 100 мл прозрачная бутылка, содержащая фосфат-буферный солевой раствор и Твин-20, концентрат 10x. (Синий раствор с прозрачной крышкой). **ПРИМЕЧАНИЕ:** 1X раствор, имеющий pH 7.2 +/- 0.2.

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 ТМВ (3,3',5,5' - тетраметилбензидином). Если ТМВ 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 пейте/курите/пейте.
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.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

ЗАБОР ОБРАЗЦОВ

В данном анализе должны использоваться только недавно собранные и должным образом хранящиеся сыворотки крови, полученные одобренными асептическими процедурами венепункции. 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.

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 при правильном его закрытии, и если индикатор остается синим.
3. Анти-человеческий козлий IgA, конъюгированный пероксидазой хрена: хранить при 2-8°C. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ.
4. Контроль и калибратор человеческих сывороток: Хранить при 2-8°C.
5. Раствор ТМВ субстрата: Хранить при 2-8°C.
6. Промывочный буфер: 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.

ПРИМЕЧАНИЕ: Все компоненты набора стабильны до окончания срока годности на этикетке. При условии строгого соблюдения рекомендуемых условий хранения. Не использовать по истечении срока годности.

ПРОЦЕДУРА

Подготовка реагентов

1. Промывочный буфер: Разбавить 100 мл 10X концентрата 900 мл дистиллированной или деионизированной воды. Тщательно перемешайте, чтобы растворить любые кристаллы, которые могут присутствовать.
2. Разбавитель образца, стоп раствор, конъюгат и растворы субстратов готовы к использованию.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

А. Подготовка к анализу

Извлеките отдельные компоненты набора, и позвольте им нагреться до комнатной температуры (20-25°C). Определите общее количество анализируемых образцов и контролей. Положительный калибратор должен анализироваться в трех экземплярах. Также, положительный контроль, отрицательный контроль и бланк реагент должны быть включены при каждом выполнении анализа. Контроли и образцы должны анализироваться в двойном экземпляре до тех пор, пока лаборатория не приобретет опыт в процедуре анализа. Каждый образец, калибратор, контроль, и бланк реагент требует одну микролунку, покрытую антигеном.

Определите количество необходимых микролунок. После нагревания полосок и рамки до комнатной температуры, вскройте защитную оболочку разрезом и извлеките планшет, содержащий микролуночные полоски, покрытые антигеном. Ненужные для анализа полоски необходимо положить в запечатывающийся мешочек, герметично закрыть и вернуть на хранение при 2-8°C.

В. Инкубация сыворотки

Приготовить 1:21 разбавление положительного и отрицательного контролей, положительного калибратора и каждой сыворотки пациента следующим образом:

1. Добавьте 100 мкл каждого образца в отдельную лунку поставляемого планшета для разбавления. Добавьте в каждую лунку 200 мкл разбавителя образца, содержащую образец.
2. При использовании многоканальной пипетки, перенесите 100 мкл каждого разбавленного образца и контролей от планшета для разбавления до планшета для анализа. Извлеките и удалите образцы несколько раз перед заключительным переносом, чтобы гарантировать, что образцы должным образом смешаны. Для каждого образца используйте отдельный наконечник пипетки. Добавьте 100 мкл разбавителя образца в лунку бланк реагента.
3. Накройте лунку накрывателем планшета и инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 25 +/- 5 минут.
4. Промойте микролуночные полоски 5X.
 - a. Энергично встряхните жидкость из лунок.
 - b. Заполните каждую лунку промывочным буфером. Удостоверитесь в отсутствии в лунках воздушных пузырьков.
 - c. Повторите этап a. и b., чтобы в сумме было пять промывок.
 - d. 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, переверните планшет и обрабатывайте гипохлоритом натрия 0.5% (10% бытовым отбеливателем).

ПРИМЕЧАНИЕ: Автопромывка - 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.

С. Инкубация конъюгата

1. Добавьте 100 мкл раствора конъюгата в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялись образцы.
2. Накройте планшет поставляемой пленкой и инкубируйте при комнатной температуре (20-25°C) в течении 10-15 минут.
3. Промойте планшет, следуя процедуре в этапе В.4 a-d.

D. Инкубация субстрата

1. Добавьте 100 мкл ТМВ раствора субстрата в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялся конъюгат.
2. Инкубируйте планшет при комнатной температуре (20-25°C) в течении 10-15 минут.
3. Добавьте 50 мкл стоп раствора в каждую лунку в том же темпе и порядке как добавлялся ТМВ раствор. Положительные образцы из синего цвета станут желтыми. После добавления стоп раствора постучите по планшету несколько раз убедившись, что образцы полностью смешаны.
4. 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.

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 положительного калибратора и значений ОП для положительного и отрицательного контролей должно находиться в пределах следующих диапазонов:

ДИАПАЗОН ОП

Отрицательный контроль	≤ 0.250
Положительный калибратор	≥ 0.300
Положительный контроль	≥ 0.500

- a. ОП отрицательного контроля, разделенная на среднюю ОП положительного калибратора должна быть ≤ 0.9.
 - b. ОП положительного контроля, разделенная на среднюю ОП положительного калибратора должна быть ≥ 1.25.
 - c. Если значения контролей вне пределов вышеупомянутых 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.
 5. Дополнительные контроли могут анализироваться согласно рекомендациям или требованиям местных, государственных и/или федеральных инструкций или аккредитованных организаций.

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	= $.793 \times 0,25 = 0,198$
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 ≤ 0,90
Сомнительные образцы .91-1,09

Положительные образцы ≥ 1.10

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Диагноз не должен делаться только на основании данного набора. Результаты по глиадину 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 IgA отрицательный результат в пациенте, не исключает целиакию, что связано с высокими уровнями антител глиадина IgG. Обнаружение можно часто объяснить выборочной недостаточностью IgA, при глютеновой болезни обнаружение случается относительно часто.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Чтобы установить или оценить ожидаемый уровень реактивности, в клинических условиях анализировались 305 образцов. Были представлены две группы образцов: 255 клинических образцов, которые были или отправлены в лабораторию для стандартного серологического анализа глиадина или были частично использованы для внешнего изучения глиадина, и 50 случайных донорских образцов в норме.

Относительно клинических пациентов, 107/255 (42.0%) были положительны, 140/255 (54.9%) были отрицательны, и 8/255 (3.1 %) были сомнительны.

Относительно пациентов в норме, 49/50 (98.0%) были отрицательны, 1/50 (2.0 %) были положительны.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

I. Сравнительное изучение:

Внутреннее сравнительное изучение было проведено, чтобы продемонстрировать работоспособность данного набора в сравнении с другим имеющимся в продаже набором глиадина IgA. Эффективность была оценена при использовании 305 образцов, и результаты, полученные в итоге, указаны ниже в Таблице 1:

Таблица 1

		Данный набор Gliadin IgA ELISA			
		-	±**	+	Общее
Имеющийся в продаже набор ELISA	-	175	2	7	184
	±**	8	2	9	19
	+	6	4	92	102
	Общее	189	8	108	305

Относительная чувствительность = $92/98 = 93.9\%$
95% Доверительный интервал = 89% до 99%

Относительная специфичность = $175/182 = 96.2\%$
95% Доверительный интервал = 93% до 99%

Относительное совпадение = $267/280 = 95.4\%$
95% Доверительный интервал = 93% до 98%

** Исключенные из вычисления данные

II. Воспроизводимость:

Изучения воспроизводимости проводились при внутреннем использовании тех же самых образцов. Изучение проводилось следующим образом:

Быстро шесть образцов были проанализированы на двух наборах из разных партий; значения находились в пределах от сильно положительных до отрицательных. В дополнение к этим шести компонентам панели, в качестве двух компонентов точности были включены положительный контроль и отрицательный контроль. Каждый образец проверен в восьми репликатах. Один раз в день, каждый на протяжении 3 дней. Полученные данные использовались для вычисления и точности в пределах и между анализами (См. данные в оригинале инструкции).

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Чтобы исследовать возможность положительных реакций исходя их влияния перекрестно реагирующих антител, данным набором анализировались 26 образцов, которые оказались реактивными к различным аутоантителам: ANA, PR3, MPO, кардиолипин, dsDNA, ENA, Jo-1, RF, Scl-70, Sm, Sm/RNP, SSA и SSB). Все двадцать шесть (26/26) были отрицательными к действию глиадина IgA. Результаты этого изучения указывают, что потенциал влияния таких аутоантител, исходя из перекрестной реактивности, маловероятен.



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
www.diameb.com