

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ IgG ДО ТРАНСГЛУТАМІНАЗИ

### 3174-17, Anti Tissue Transglutaminase IgG ELISA

Каталог. №: 3174-17

Методика від 11-05-2012

Кількість : 96

Виробник : **DAI, (США)**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадатим.

#### ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ

Кількість тестів	96 тестів
Тест	Anti Tissue Transglutaminase IgG ELISA
Метод	Непрямий - Твердої фази ІФА
Діапазон визначення	0.12 АОд/мл - 20 АОд/мл
Принцип	Кількісний
Зразок	10 мкл
Специфічність	90.9 %
Чутливість	81.0 %
Загальний час	~ 755 хвилин
Термін придатності	12-14 місяців

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Anti Tissue Transglutaminase IgG ІФА тест є непрямим аналізом твердої фази для кількісного визначення антитіл IgG до Трансглютамінази в сироватці або плазмі. Anti Tissue Transglutaminase IgG ELISA призначений для використання тільки в лабораторії. В якості допоміжного засобу може використовуватись в in-Vitro діагностиці для виявлення глютеїнової хвороби і герпетичного дерматиту.

#### РЕЗЮМЕ І ОПИС (Див. оригінал інструкції англ. мовою).

#### ПРИНЦИП ТЕСТУ

Принцип дії даного тесту - це процес 3 інкубацій, в якому під час першої інкубації (30 хвилин) відбувається зв'язування антитіл до трансглютамінази в сироватці/плазмі, які були нанесені на мікропланшет. Після цього видаляється сироватка, яка не прореагувала.

На другому етапі інкубації (30 хвилин) кон'югат анти-людського IgG з пероксидазою хрому буде зв'язуватися з антитілами класу IgG, які пов'язані з іммобілізованими антигенами. Після інкубації надлишки незв'язаного кон'югату будуть вимиті.

На цьому етапі додається розчин хромогену (Тетраметилбензидин або ТМБ). Після 15-хвилинної інкубації розчин набуває синього кольору. Після додавання стоп-розчину, розчин стає жовтим. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості антитіл IgG в пробі.

#### МАТЕРІАЛИ ТА КОМПОНЕНТИ

**Матеріали, які входять до складу набору:**

- Anti-Tissue Transglutaminase IgG калібратори (6 флаконів, 1.2 мл кожен)**  
0,1 М фосфатний буфер, NaN3 < 0.1%, сироватка людини.  
CAL0  
CAL1  
CAL2  
CAL3  
CAL4  
CAL5
- Контроль (2 флакона, 1.2мл кожен)**  
0,1 М фосфатний буфер, NaN3 < 0.1% сироватка людини.  
Негативний контроль  
Позитивний контроль
- Розчин для розведення зразків (1 флакон, 100 мл)**  
0,1 М фосфатний буфер, NaN3 < 0.1%.
- Кон'югат (1 флакон, 15 мл)**  
Кон'югат анти-людського-IgA з пероксидазою хрому, BSA 0.1 %.  
Proclin < 0.0015%
- Мікропланшет**  
(1 мікропланшет, покритий людською рекомбінантною тканинною трансглютаміназою).

- ТМБ Субстрат (1 флакон, 15 мл)**  
3,3', 5,5' - Тетраметилбензидин 0.26 г/л, перекис водню 0.05%.
- Стоп-розчин (1 флакон, 15 мл)**  
Сірчана кислота 0.15 М
- 10X Концентрат Промивного Розчину(1 флакон, 50 мл)**  
0,2 М фосфатний буфер, проклін < 0.0015%

#### Необхідні матеріали, що не входять до набору

- Дистильована вода.

#### Допоміжні матеріали та прилади

- Автоматичний диспенсер для доставки 5, 100, 300 і 500 мкл.
- Одноразові наконечники для мікропіпеток.
- Пробірки для розведення зразків пацієнта.
- 1 л контейнер для розчину для промивання.
- Мікропланшетний зчитувач (450 нм).

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

##### Підготовка Калібратора (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Оскільки не існує еталонного методу приготування для антитіл тканинної Трансглютамінази, система аналізу відкалібрована у відносних умовних одиницях. Калібратори готові до використання і мають наступні концентрації:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
АОд/мл	0	5	20	40	80	320

Після відкриття калібратори є стабільними на протязі 6 місяців при 2-8 °С.

##### Підготовка взірця

Зразками для проведення тесту є сироватка або плазма людини. **Всі зразки сироватки або плазми повинні бути попередньо розведені 1:100 з Розчином для розведення;** наприклад 10 мкл зразка можуть бути розведені з 990 мкл Розчину для розведення. Взірці мають бути чистими. Забруднення ліпемією краще уникати, але воно не впливає на результати аналізу.

Провести забір венозної крові і відокремити сироватку (після утворення згустку) або плазму від клітин шляхом центрифугування. Зразки можна зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °С до 5 днів або до 6 місяців при -20 °С. Уникати повторного заморожування і відтавання. Це може призвести до втрати активності аутоантитіл. Тестування інактивованого нагріванням зразку не рекомендується.

##### Підготовка Промивного Розчину

Розвести вміст кожного флакона Концентрату буферного розчину для промивання (10x) дистильованою водою до кінцевого об'єму 500 мл перед використанням. Для невеликих обсягів використовувати 1:10 розведення. Розведений Промивний розчин стабільний протягом 30 днів при 2-8 °С.

У концентрованому Промивному розчині можна спостерігати присутність кристалів. У цьому випадку, перемішати при кімнатній температурі до повного розчинення кристалів. Для більшої точності розбавити цілу пляшку концентрованого Розчину для промивання до 500 мл, впевнившись у тому, що кристали повністю розчинились.

#### ПРОЦЕДУРА

- Привести всі реагенти до кімнатної температури (22-28 °С) протягом принаймні 30 хвилин.**
- Невикористані смужки помістити в пакет з фольги, який містить осушувач, і зберігати при температурі 2-8 °С.
- Щоб уникнути можливого мікробного і/або хімічного забруднення, залишки невикористаних реагентів ніколи не повертати назад в оригінальні флакони.
- Оскільки необхідно виконати визначення у двох примірниках з метою поліпшення точності результатів випробувань, підготувати дві лунки для кожної точки калібрувальної кривої (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), дві для кожного Контроля, дві для кожного зразка, одну для Бланка.

Реагент	Калібратор	Взірець /Контроль	Бланк
Калібратор C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 мкл		
Контролі		100 мкл	
Розведений Візірець		100 мкл	
Інкубувати на протязі 30 хвилин при КТ (22-28 °С). Видалити вміст кожної лунки, промити лунки 3 рази з 300 мкл розведеного Промивного розчину.			
Кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубувати на протязі 30 хвилин при КТ (22-28 °С). Видалити вміст кожної лунки, промити лунки 3 рази з 300 мкл розведеного Промивного розчину.			
Субстрат ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубувати на протязі 15 хвилин при КТ (22-28 °С) в темноті.			
Стоп Розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Обережно потрясти мікропланшет. Зчитати щільність (Е) при 450 нм в порівнянні з Бланком на протязі 5 хвилин.			

## КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

1. Позитивний і негативний контролю повинні тестуватись з кожною серією зразків для того, щоб забезпечити належну роботу всіх реагентів та процедур.
2. Тому що Позитивний і Негативний контролю попередньо розведені, вони не контролюють процедурні методи, пов'язані з розведенням зразків.
3. Додаткові підходящі контрольні сироватки можуть бути отримані шляхом аликвоти пулу людських зразків сироватки та зберігання їх при  $-20^{\circ}\text{C}$ .
4. Для того, щоб результати випробувань вважались дійсними, всі критерії, перераховані нижче, повинні бути задоволені. Якщо який-небудь з них не виконується, тест вважається недійсним і необхідно провести повторний аналіз:
  - Оптична щільність розведеного Позитивного л-ТТГ IgG повинна бути більше ОЩ розведеного Негативного контролю.
  - Негативний і позитивний контроль призначені для контролю істотного відхилення в роботі реагенту і вони не будуть забезпечувати точність значення cut-off у цьому аналізі.
  - Цей тест вважається дійсним лише якщо оптична щільність при 450 нм для Позитивного контролю та Негативного контролю, а також для калібраторів C0-C5 відповідає вказаному в сертифікаті якості діапазону, що додається до кожного набору; Якщо будь-який з цих критеріїв не виконується, результати аналізу вважаються недійсними і випробування слід повторити.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Для даного аналізу методом для оцінки результатів є 4-параметрова крива з Lin-Log для оптичної щільності і концентрації відповідно. Крім того, можна використовувати наближений згладжений сплайн і координований Lin-Log метод. Тим не менше, рекомендується використовувати криву Lin-Log.

Спочатку розрахувати середню оптичну щільність калібраторів. Використовуючи міліметровий папір, відкласти середню оптичну щільність кожного калібратора проти їх концентрацій. Намалювати найбільш відповідну криву апроксимації через всі точки калібратора. Точки Калібратора також можуть бути з'єднані з прямолінійними відрізками. Концентрації невідомих зразків можуть бути оцінені по калібрувальній кривій шляхом інтерполяції.

У дослідженні нормальних значень, проведеному із зразками сироватки від здорових донорів, були отримані наступні інтервали нормальних значень.

Anti Tissue Transglutaminase IgG (AU/mL)	
Cut-Off	20

Зверніть увагу на те, що визначення діапазону очікуваних значень "нормального" населення в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфічність і чутливість методу і типу населення, яке аналізується. Таким чином, кожна лабораторія повинна розглянути діапазон, рекомендований виробником в якості загальних вказівок, і встановити свій власний діапазон очікуваних значень на основі даних по населенню, де працює лабораторія.

Позитивні результати повинні бути перевірені щодо клінічного стану пацієнта. Крім того, кожне рішення, пов'язане з терапією, повинно бути прийнято на індивідуальній основі. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні інтервали норми і патології сироваткових анти-tTG.

## РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Точність і відтворюваність

Точність і відтворюваність оцінюють вимірюванням восьми реплік двох позитивних проб в двох різних аналізах з двома різними лотами.

Операції дозування і промивання були виконані вручну оператором. Результати з точки зору відхилення калібратора і коефіцієнта варіації представлені нижче:

Взрієць	1		2	
	SD	SV %	SD	SV %
В тесті	12.49	7.1	7.85	6.7
Між тестами	0.36	3.8	12.37	7.5

### Специфічність

Порівняльний тест проти комерційного набору, виконаний на 32 сироватках (18 з них позитивні сироватки і 14 негативних сироваток), показав 90.9 % специфічності.

## Чутливість

Порівняльний тест проти комерційного набору, виконаний на 32 сироватках (18 з них позитивні сироватки і 14 негативних сироваток), показав 81.0 % чутливості.

## Межа виявлення

Найнижча концентрація анти-tTG IgG, яку можна відрізнити від Нульового калібратора, становить 0.12 АОд/мл з межею достовірності 95 %.

## ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти повинні бути утилізовані відповідно до місцевих правил.

## ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Присутність імунних комплексів або інших агрегатів імуноглобулінів у зразку пацієнта може призвести до підвищеного рівня неспецифічного зв'язування і помилкових позитивних результатів в цьому аналізі.
2. Негативний л-tTG IgG результат у пацієнта, який не пройшов лікування, не виключає ентеропатії. Пацієнт може бути IgA позитивний або не мати антитіл до ТТГ.

## ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Цей набір призначений для лабораторного використання відповідними фахівцями. Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах.
2. Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту при роботі з реагентами.
3. Дотримуйтесь рекомендацій належної лабораторної практики (GLP) для обробки продуктів крові.
4. Всі компоненти людського походження, що використовуються при отриманні реагентів, були перевірені та визнані негативними на антитіла до ВІЛ-1 і 2, HBsAg і HCV. Але ніякі тести не можуть дати повної гарантії, що відсутні ВІЛ, гепатит або інші інфекційні агенти. Таким чином, з калібраторами і контролями поводиться таким же чином, як і з потенційно інфекційним матеріалом.
5. Матеріали тваринного походження, що використовуються у приготуванні набору, були отримані від здорових тварин, і бичачий білок був отриманий з країн, не заражених BSE, але з цими матеріалами слід поводитись як з потенційно інфікованими.
6. Деякі реагенти містять невеликі кількості азиду натрію (NaN<sub>3</sub>), або Проклін 300<sub>R</sub> в якості консервантів. Уникати попадання на шкіру або слизову оболонку.
7. Азид натрію може бути токсичний при попаданні всередину або всмоктуванні через шкіру або очі; крім того, він може реагувати з свинцем або міддю з утворенням потенційно вибухонебезпечних азидів металів. Змити великою кількістю води, щоб запобігти накопиченню азиду.
8. ТМБ субстрат містить подразник, який може заподіяти шкоду при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб запобігти травмам, уникайте вдихання, ковтання або при контакту зі шкірою та очима.
9. Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота є отруйною і корозійною і може бути токсичною при ковтанні. Для запобігання хімічного опіку, уникайте контакту зі шкірою та очима.
10. Уникайте впливу прямого сонячного світла, металів або оксидантів на реагент ТМБ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Не заморожувати розчин.
11. Строго дотримуватися послідовності піпетування, описаній в протоколі. Продуктивність даних, представлених тут, була отримана з використанням специфічних реагентів, перерахованих в цій Інструкції з експлуатації.
12. Всі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2-8 °C в оригінальній упаковці. Усі винятки чітко вказано. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при зберіганні і використанні, як зазначено.
13. Привести всі компоненти набору та зразки до кімнатної температури (22-28 °C) і добре перемішати перед використанням.
14. Не змішувати компоненти набору з різних партій. Термін придатності, зазначений на коробці і етикетках флаконів, повинні бути дотримані. Не використовуйте компонент набору за межами їх терміну придатності.
15. **ПОПЕРЕДЖЕННЯ:** кон'югат призначений для забезпечення максимальної дози чутливості і може бути забруднений зовнішніми агентами, якщо не використовується належним чином: тому, рекомендується використовувати одноразові витратні матеріали (наконечники, пляшки, лотки тощо). Для розділених доз взяти точний об'єм необхідного Кон'югату і не повертати будь-які залишки продукту в оригінальну пляшку. Крім того, **для об'ємів, які подаються за допомогою автоматичних та напіваавтоматичних пристроїв**, перш

ніж додавати кон'югат, бажано очистити рідину з системи обробки, забезпечуючи ефективність процедури промивання, депротейнізації і дезактивації, щоб запобігти забруднення кон'югату; ця процедура є дуже необхідною, коли набір використовує аналізатори, які не обладнані одноразовими наконечниками.

Для цього DAI постачає окремий реагент знезараження для чищення голок.

16. При використанні автоматизованого обладнання, користувач несе відповідальність, що набір належним чином перевірений.
17. Неповне або неточне видалення рідини з лунок може впливати на точність аналізу та/або зростання заднього фону.
18. Важливо, щоб час реакції для кожної лунки був стабільним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно займати більше десяти хвилин, щоб уникнути зміщення результатів тесту. Якщо необхідно більше 10 хвилин, слідувати тому ж порядку піпетування. Якщо використовується більш ніж один планшет, рекомендується повторити побудову калібрувальної кривої для кожного планшета.
19. Додавання розчину субстрату ТМБ субстрату провокує кінетичну реакцію, яка зупиняється додаванням стоп розчину. Таким чином, субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додати в тій же послідовності, щоб усунути будь-які відхилення часу в ході реакції.
20. Дотримуйтеся вказівок для проведення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу Контролей та/або збагачених сироваток.
21. Максимальна точність потребується для приготування та піпетування реагентів.
22. Не використовувати зразки, які заражені хвороботворними бактеріями, високо ліпемічні або гемолізовані.
23. Планшетний рідер вимірює вертикально. Не торкатися нижньої частини лунок.



#### **ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 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)