



## Набор ИФА

### для количественного определения в человеческой сыворотке или плазме тканевых антител трансглутаминазы класса IgA

**Кат. №** : K10TA  
**Количество** : 96  
**Производитель** : Radim (Италия)

Методика от 04-2008

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

**ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ IN VITRO**

#### 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(См. оригинал инструкции).

#### 2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ основывается на методе иммуно-ферментного анализа (ИФА), где пероксидаза хрена используется как ферментный трейсер. В процессе первой инкубации антитела образца анти-трансглутаминазы IgA, если не другие, связываются с лунками, привитыми трансглутаминазой (человеческий рекомбинант от бакуловируса). Промывочный цикл удаляет несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (конъюгированное пероксидазой хрена) связывается с комплексом трансглутаминаза-антиген-антитело. В результате последующего промывочного цикла бесцветный раствор (ТМВ) добавляется в лунки, где формируется цветной комплекс путем реакции с ферментом пероксидазы. Образование цвета останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность цвета измеряется спектрофотометром при 450 нм, которая прямо пропорциональна концентрации антител анти-трансглутаминазы IgA, присутствующих в калибраторах, контрольной сыворотке и образцах.

#### 3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПОДГОТОВКА И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок.  
- хранить набор при 2-8<sup>0</sup>С.  
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона.  
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8<sup>0</sup>С в течение 1 месяца.

##### 3.1 Специфические реагенты

- Обработанный микропланшет:** 96 делимых лунок с привитой трансглутаминазой (человеческий рекомбинант от бакуловируса). Хранить неиспользуемые лунки при 2-8<sup>0</sup>С в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- Калибраторы:** 5 флаконов с анти-трансглутаминазой IgA в основе сыворотки в следующих концентрациях: 0, 7, 25, 50 и 100 Е/мл. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Готовы к использованию, красного цвета.
- Контроли:** 2 флакона с анти-трансглутаминазой IgA в основе сыворотки с разными концентрациями. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Готовы к использованию, красного цвета.
- Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышиного моноклонального анти-человеческого IgA, конъюгированного с HRPO, в основе сыворотки со

стабилизаторы. Консервант: тимеросал (<0.01%). Готов к использованию.

- Разбавитель образца:** 1 флакон (100 мл) основы сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN<sub>3</sub> (<0.1%). Готовы к использованию.

#### 3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для наборов следующих направлений: To.R.C.H.-S.T.D., детские, гастро-энтерологические и глютеносвязанные болезни.

- Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл). Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворимых кристаллов, ресуспендировать раствор, поместив его на несколько минут в температуру 37<sup>0</sup>С. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8<sup>0</sup>С.
- Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером, ДМСО и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Готовый к использованию.
- Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Жидкий.
- Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Готов к использованию.
- Самоклеющиеся пленки для планшета**
- Полиэтиленовый пакет.**

#### 4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

##### 4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
- Центрифуга, настроенная на 1200 об/мин..
- Градуированные пробирки для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный фотометр с фильтром 450, 405 и 620 нм (диапазон 0-3,0 ОП).
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

##### 4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ИФА.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ИФА.

#### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

**Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:**

- Не смешивайте специфические реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре,
 это может вызвать неправильные клинические результаты.

- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбопытная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

#### Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

#### 6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Соберите образцы крови, сыворотки или плазмы обычной венопункцией при соблюдении необходимых правил безопасности. Для получения точных результатов, необходима утренняя сыворотка пациента, который воздерживается от приема пищи. Кровь нужно собрать в обычную пробирку с красной полоской для венопункции, не используя никаких добавок или гелевых барьеров. Дайте возможность крови сгуститься. Центрифугируйте образец для отделения сыворотки от клеток. Образцы могут

храниться при 2-8 °C на протяжении 1 недели. Если образцы не использованы на протяжении этого времени, их можно хранить при температуре -20 °C до 30 дней. Избегайте повторных замораживаний и размораживаний.

#### Разбавление образца

Перед анализом разбавьте образцы 1:100 разбавителем образца следующим образом: **10 мкл** образца + **990 мкл** разбавителя.

#### 7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
- переворачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для бланка, контролей, калибраторов и образцов.
2. Раскапать в соответствующие лунки **100 мкл** контролей, калибраторов и разбавленных образцов.  
**Примечание: контроли и калибраторы не должны разбавляться.**
3. Внесите **100 мкл** разбавителя образца в лунку бланка.
4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.**
5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленным промывочным раствором. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
6. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **30+/-2 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.**
8. Промойте лунки как описано в п 5.
9. Внесите во все лунки по **100 мкл** хромогена.
10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 18-25°C при 1200 об/мин.** Избегайте попадания прямого солнечного света.
11. Добавьте **100 мкл** стоп-раствора во все лунки.
12. Считайте ОП бихроматичным фотометром при 450 нм с контрольной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

\* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

#### 8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 22 в оригинале инструкции).

#### 9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ\*

Нарисуйте калибровочную кривую на линейной графической бумаге, выводя концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации анти-трансглутаминазы IgA в Е/мл получают путем интерполяции абсорбции каждого образца на калибровочной кривой.

\*При использовании автоматических микропланшетных аппаратов SEAC или Radim, спектрофотометрическое считывание будет проводится автоматически при 3 разных волнах: 450, 405 и 620 нм, позволяя этим расширить диапазон калибровочной кривой.

#### 9.1 Пример вычисления

Значения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание		Абсорбция 450 нм	Анти-трансглутаминаза IgA
Калибратор	0 Е/мл	0,003	
Калибратор	7 Е/мл	0,813	
Калибратор	25 Е/мл	2,365	
Калибратор	50 Е/мл	3,340	
Калибратор	100 Е/мл	4,159	
Отриц. контр. - сыворотка		0,306	2.60 Е/мл
Полож. контр. - сыворотка		2,541	29,5 Е/мл
Образец 1		0,151	1,30 Е/мл
Образец 2		3,109	44,1 Е/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует титр анти-трансглутаминазы IgA 1,30 и 44,1 Е/мл.

## 9.2 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что концентрации контролей находятся в пределах как указано в брошюре контроля качества.

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль - сыворотка	2,2-3,0 Е/мл
Положительный контроль - сыворотка	25-40 Е/мл
ОП кал. 100 Е/мл / ОП кал. 7 Е/мл	> 2,8
ОП кал. 7 Е/мл / ОП кал. 0 Е/мл	> 4,2

## 9.3 Интерпретация результатов

Количество анти-трансглутаминазы IgA в здоровых людей (без гастроэнтерологических расстройств) на уровне ниже 7 Е/мл. Образцы с уровнем IgA равном 5-7 Е/мл должны считаться граничными, анализ которых должен подтвердиться повторно: считаться граничными, анализ которых должен подтвердиться повторно:

Нормальные значения	≤ 5 Е/мл
Граничные значения	5-7 Е/мл
Патологические значения	≥ 7 Е/мл

## 10. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА

### 10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность была метода была оценена на группе здоровых лиц. Результат составил **98,57%**.

Диагностическая чувствительность была метода была оценена на соответствующей группе лиц, которые были инфицированы глиадином. Результат составил **100%**.

### 10.3 Аналитическая специфичность

Аналитический метод не демонстрирует положительной реакции пациентов к тиреоидной аутоиммунной болезни или пациентов с гастроэнтерологическими болезнями.

### 10.4 Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность выражается в минимальной дозе, которая показывает значительное расхождение с нулевым калибратором. Проверена путем пипетирования 10 репликантов нулевого калибратора и считыванием среднего значения ОП + 2 СО, исходя из калибровочной кривой. **Доза составляет 0,1 Е/мл.**

### 10.5 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 4 сывороток при разных концентрациях анти-трансглутаминазы IgA.

#### Повторяемость (внутри анализа)

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во репликантов
A1	0,94	0,05	5,3	18
A2	4,2	0,4	8,6	18
A3	19,1	1,1	5,7	18
A4	42	3,1	7,4	18

#### Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (Е/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
A1	3,3	0,3	8,8	13
A2	5,6	0,5	8,1	13
A3	18,1	1,1	6,0	13
A4	23,4	2,6	11,2	13

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Черновола, 97,  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 77 51 22;  
тел./факс: +38 (0342) 77 56 12  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)