



ИФА для количественного определения антител класса IgA к ГЛИАДИНУ в человеческой сыворотке или плазме

Кат. № : 107-K9GA
Количество : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 05-2008
Версия 10

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

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(См. в оригинале инструкции).

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ основывается на методе иммуноферментного анализа (ELISA), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. В процессе первой инкубации анти-глиадин IgA антитела образца, если не другие, связываются с лунками, покрытыми глиадином. Промывание удаляет несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (анти-человеческие IgA, конъюгированные пероксидазой хрена) связываются с комплексом глиадин-антиген-антитело. В результате последующего промывочного цикла бесцветный раствор хромогена (ТМВ) в субстратном буфере 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 анти-глиадин IgA антител, присутствующих в калибраторах и образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитым глиадином. Хранить неиспользуемые лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.
- **Калибраторы:** 2 набора: 4 флакона (2 мл) с анти-глиадином IgA в основе сыворотки в следующих концентрациях: 0, 50, 100 и 200 RU/мл. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию, лиофилизированные и красного цвета. Разбавить 1 мл дистиллированной воды. После разбавления хранить при 2-8°C в течение 3 недель, при более длительном хранении заморозить до -20°C.
- **Ферментный конъюгат:** 1 флакон (14 мл) мышинового моноклонального анти-человеческого IgA, конъюгированного с HRPo, в основе сыворотки со стабилизатором fvb. Консервант: неомидин. Готов к использованию, розового цвета.

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: тиомерсал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, заново восстановите раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C. Хранить разбавленный промывочный раствор в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки и стабилизаторов. Красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 с предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить в течение 30 дней при 2-8°C.
- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером, DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.

- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готов к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета**
- **Полиэтиленовый пакет.**

2. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
- Инкубатор, настроенный на 37 +/- 2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с диапазоном 0-3,0 А, способный измерять абсорбцию при 450 и 405.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- 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 ELISA.

5. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Не смешивайте специфичные 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 пейте 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

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Умеренно липемические или гемолизированные образцы могут повлиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разбавителя образца.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

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

1. Приготовьте лунки для бланка, калибраторов и образцов.
2. Раскапайте **100 мкл** перерастворенных калибраторов и **100 мкл** разбавленных образцов в соответствующие лунки.
3. Раскапайте **100 мкл** разбавленного разбавителя образца в лунку бланка.
4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60 +/- 5 минут при 37 +/- 2°C**.
5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. 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 37 +/- 2°C**.
8. Промойте лунки как описано в п 5.
9. Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37 +/- 2°C** или **15 минут** при комнатной температуре (18-25°C). Избегайте попадания прямого солнечного света.
11. Добавьте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
12. Считайте ОП желательным бихроматичным спектрофотометром при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настройте аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

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

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 23 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-глиаина IgA в RU/мл получаются 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 длиной: 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-глиадин IgA
Калибратор 0 RU/мл	0,050	
Калибратор 50 RU/мл	0,600	
Калибратор 100 RU/мл	1,700	
Калибратор 200 RU/мл	2,500	
Образец	1,830	116 RU/мл

Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует для анти-глиаина IgA титр в 116 RU/мл.

9.2 Критерии правильности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
ОП кал. 200 RU/мл / ОП кал. 50 RU/мл	> 1,7
ОП кал. 50 RU/мл / ОП кал. 0 RU/мл	> 3,98

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

9.3 Интерпретация результатов

Количество анти-гипдина IgA в здоровых людей (без гастроэнтерологических расстройств) отличаются от возраста. Для интерпретации результатов предлагаются следующие нормальные значение:

Возраст	
0-5 лет	≤ 40 RU/мл
> 5 лет	≤ 20 RU/мл

Значения пациентов в пределах +/- 10% от их возраста считаются сомнительными.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на соответствующей группе лиц без иммунитета к инфекции глиаина. Результат составил 97,8%.

10.2 Диагностическая чувствительность

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

10.3 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 3 сывороток при разных концентрациях анти-глиаина IgA.

Повторяемость (внутри анализа)

Сыворотка	Средн. (RU/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	65,3	3,13	4,8	14
b	32,1	1,28	4,0	14
c	51,2	1,86	3,6	14

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (RU/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	55,8	5,01	9,0	12
b	27,8	3,2	11,5	12
c	50,4	5,92	11,7	12

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Определенный диагноз глютеновой болезни может быть сделан только на основании слизистой биопсии тонкой кишки. Анализ анти-глиадин IgA и IgG антитела может указывать на этот симптом и служить направлению пациента к проведению биопсии.

Высокие титры антител анти-глиаина можно обнаружить при других гастроэнтерологических болезнях как болезнь крона, язвенный колит и эзофагит. Низкие количества анти-глиадин IgA антител были обнаружены в некоторых случаях глютеновой болезни исходя из определенной недостаточности IgA.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97,
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 77 51 22;
тел./факс: +38 (0342) 77 56 12
E-mail: info@diameb.com