

ЗМІСТ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ	2
2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ	3
3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СКЛАД НАБОРУ	4
5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ	5
6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ	5
7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ	5
8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ	6
9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ	7
10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ	9
11. ЛІТЕРАТУРА	9

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ НАБОРУ РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ КЛАСУ G ПРОТИ ТКАНИННОЇ ТРАНСГЛЮТАМІНАЗИ В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ «анти-Трансглютаміназа ІgG-ІФА»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «анти-Трансглютаміназа ІgG-ІФА» призначений для кількісного визначення концентрації антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази у сироватці (плазмі) крові методом твердофазного імуноферментного аналізу.

1.2. Целіакія або глютен-чутлива ентеропатія - хронічне захворювання, при якому порушується кишкове всмоктування в результаті ураження слизової тонкого кишечника. Точна етіологія целіакії невідома, але встановлено, що гліадин – спиртоторозчинна фракція глютену злаків - при даному захворюванні є токсичною речовиною. Гліадин є субстратом тканинної траснглютамінази (ТГлю) – кальцій залежного ферменту, що входить до складу кишкової стінки. Утворений комплекс гліадину із ТГлю є комплексним антигеном, що викликає у хворих на гостру целіакію вироблення ІgА, а потім і ІgG-антитіл. Раніше антитіла проти ТГлю називалися антитілами проти ендомізії (ЕМА) та виявлялися методом імунофлюоресценції на гладких субстратах. Після виключення глютену із раціону рівень цих антитіл поступово нормалізується. Для остаточного підтвердження діагнозу целіакії використовується біопсія слизової в області переходу дванадцятипалої кишки в тонку. У цьому місці характерні ураження («плоска» слизова) виявляються і при важкій, і при помірній целіакії. Визначення антитіл проти ТГлю дозволяє точно визначити показання для проведення кишкової біопсії. Зазвичай целіакія починається у грудному віці після введення прикорму, але симптоми можуть спонтанно зникнути в дитинстві або в підлітковому віці, незважаючи на триваючу мальабсорбцію. Однак навіть такі «стерті» форми можуть призводити до затримки росту, статевого дозрівання і навіть до карликовості. Проте, зазвичай після подібної клінічної ремісії класичні симптоми целіакії дорослих проявляються на третьому-шостому десятилітті життя, але діагноз целіакії в цій групі хворих часто ставиться із запізненням. «Стерті» і безсимптомні форми целіакії дорослих зазвичай проявляються у вигляді незрозумілої анемії, гіпоспленізму або остеопорозу. Виправдано, в тому числі і з економічної точки зору, проведення скринінгу на целіакію в наступних групах населення: діти із затримкою росту; незрозумілою анемією; незрозумілою гіпокальціємією або остеомалаяцією; затримкою статевого дозрівання; інсулін-залежним діабетом; наявністю близьких родичів, хворих на целіакію; аутоімунним тиреоїдитом; системними захворюваннями сполучної тканини; селективним дефіцитом ІgА.

2. ПРИНЦИП РОБОТИ НАБОРУ

Визначення антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази ґрунтується на використанні непрямого твердофазного імуоферментного аналізу. На внутрішній поверхні лунок планшета іммобілізований антиген - тканинна трансглютаміназа. Антитіла із зразка зв'язуються з антигеном на поверхні лунки.

Комплекс, що утворився, виявляють за допомогою кон'югату мишачих моноклональних антитіл проти IgG людини з пероксидазою хрину. У результаті утворюється зв'язаний із твердою фазою комплекс, що містить пероксидазу. Під час інкубації із розчином субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) рідина в лунках забарвлюється. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентрації специфічних антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази. Концентрацію антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази в досліджуваних зразках визначають за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від вмісту антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази в калібрувальних пробах.

3. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфічність.

Використання високоочищеного препарату дозволяє досягти високої специфічності аналізу.

3.2. Відтворюваність.

Коефіцієнт варіації результатів визначення вмісту анти-ТГлю IgG у тому самому зразку сироватки (плазми) крові із використанням Набору «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА» не перевищує 8%.

3.3. Лінійність.

Залежність концентрації анти-ТГлю IgG у зразках сироватки (плазми) крові при розведенні їх сироваткою (плазмою) крові, що не містить анти-ТГлю IgG, має лінійний характер в діапазоні концентрацій 10-200 Од/мл та складає $\pm 10.0\%$.

3.4. Точність.

Даний аналітичний параметр перевіряється тестом на «відкриття» – відповідність вимірної концентрації анти-ТГлю IgG підготовленої проби, отриманої шляхом змішування рівних об'ємів контрольної сироватки та калібрувальної проби 25 Од/мл. Відсоток «відкриття» складає 90–110%.

3.5. Чутливість.

Мінімальна достовірно визначувана Набором «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА» концентрація анти-ТГлю IgG у сироватці (плазмі) крові не перевищує 1.0 Од/мл.

4. СКЛАД НАБОРУ

	Код компонента	Символ	Найменування	К-ть	Од.	Опис
1	P160Z	SORB MTP	Планшет 96-лунковий полістироловий, стріпований, готовий до використання	1	шт	-
2	C160Z	CAL 1-6	Калібрувальні проби на основі фосфатного буфера (pH 7.2-7.4), що містять відомі кількості антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази – 0; 10; 25; 50; 100; 200 Од/мл , готові до використання (по 1.1 мл кожна)	6	шт	прозора рідини червоного кольору (калібрувальна проба C1 – прозора безбарвна рідина)
3	Q160Z	CONTROL	Контрольна сироватка на основі сироватки крові людини з відомим вмістом антитіл класу G проти тканинної трансглютамінази, готова до використання (по 1,1 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
4	T160Z	CONJ HRP	Кон'югат , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора рідина червоного кольору
5	SP160Z	DIL SPE	Буфер для розведення зразків , готовий до використання (50 мл)	1	шт	прозора рідина синього кольору
6	R055Z	SUBS TMB	Розчин субстрату тетраметилбензидину (ТМБ) , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
7	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат розчину для відмивання , 26х-кратний (22 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
8	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готовий до використання (14 мл)	1	шт	прозора безбарвна рідина
9	N003	-	Плівка для заклеювання планшета	2	шт	-
10	K160I	-	Інструкція з використання Набору реагентів «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА»	1	шт	-
11	K160Q	-	Паспорт контролю якості Набору реагентів «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА»	1	шт	-

5. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

5.1. Всі компоненти Набору, за винятком стоп-реагенту (5,0% розчин сірчаної кислоти), у концентраціях, що використовуються, є нетоксичними.

Розчин сірчаної кислоти має подразнюючу дію; при роботі з ним потрібно уникати його розбризкування та потрапляння на шкіру і слизові оболонки. При потраплянні на шкіру і слизові оболонки уражену ділянку слід промити великою кількістю проточної води.

5.2. При роботі з Набором слід дотримуватись НПАОП 85.14-1.09-81. Правила влаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарно-епідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров'я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81).

5.3. При роботі з Набором необхідно користуватися одноразовими гумовими або пластиковими рукавичками, оскільки зразки крові людини слід розглядати як потенційно інфікований матеріал, здатний тривалий час зберігати і передавати віруси ВІЛ, гепатиту або будь-який інший збудник вірусної інфекції.

5.4. Не використовуйте Набір з ознаками пошкодження.

6. ОБЛАДНАННЯ ТА МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕОБХІДНІ ПІД ЧАС РОБОТИ З НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканування, що дозволяє вимірювати оптичну густину вмісту лунок планшета при довжині хвилі 450 нм;
- термостат, що підтримує температуру $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$;
- дозатори зі змінними наконечниками, що дозволяють відбирати об'єми в діапазоні 5–250 мкл;
- циліндр мірний об'ємом 1000 мл;
- вода дистильована;
- рукавички гумові або пластикові;
- папір фільтрувальний.

7. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

7.1. Перед проведенням аналізу компоненти Набору і досліджувані зразки сироватки (плазми) крові слід витримати при кімнатній температурі ($+18...+25^{\circ}\text{C}$) не менше 30 хв.

7.2. Приготування планшета.

Відкрити пакет із планшетом і встановити в рамку необхідну кількість стрипів. Стрипи, що залишилися невикористаними, ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета з метою запобігання впливу вологи на лунки планшета. Планшет зберігати при температурі $+2...+8^{\circ}\text{C}$ протягом всього терміну придатності Набору.

7.3. Приготування розчину для відмивання.

Вміст флакона з концентратом розчину для відмивання (22 мл), перенести в мірний циліндр об'ємом 1000 мл, додати 550 мл дистильованої води та ретельно перемішати. В разі часткового використання Набору слід відібрати необхідну кількість концентрату розчину для відмивання і розвести дистильованою водою в 26 разів (до 1 мл концентрату розчину для відмивання додати 25 мл дистильованої води).

8. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ЕКСПЛУАТАЦІЇ НАБОРУ

8.1. Набір реагентів «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА» потрібно зберігати в упаковці підприємства-виробника при температурі +2...+8°C протягом усього терміну придатності, який вказаний на пакуванні Набору.

Допускається зберігання (транспортування) Набору при температурі до +25 °C не довше 15 діб. Не допускається заморожування цілого набору.

8.2. Набір розрахований на проведення аналізу в двох повторях 41 досліджуваного зразка, 6 калібрувальних проб та 1 контрольної сироватки (всього 96 визначень).

8.3. У випадку часткового використання Набору, компоненти необхідно зберігати в такий спосіб:

- стрипи, що залишилися невикористаними, необхідно ретельно заклеїти плівкою для заклеювання планшета та зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- буфер для розведення зразків, кон'югат, субстрат, стоп-реагент після відкриття флаконів необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- калібрувальні проби та контрольну сироватку, після відкриття флаконів, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C не довше 2 місяців;
- концентрат розчину для відмивання, що залишився невикористаним, необхідно зберігати при температурі +2...+8°C протягом всього терміну придатності Набору;
- готовий розчин для відмивання необхідно зберігати при кімнатній температурі (+18...+25°C) не довше 15 діб або при температурі +2...+8°C не довше 45 діб.

Важливе зауваження: Після використання реагенту закривайте флакон кришкою. Закривайте кожний флакон відповідною кришкою.

8.4. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, непрозору сироватку (плазму) крові, а також сироватку (плазму) крові, що містить азид натрію. В разі проведення аналізу не в день взяття крові, сироватку (плазму) слід зберігати при температурі -20°C. Не допускається повторне заморожування/розморожування зразків.

8.5. Дослідження зразків сироватки (плазми) крові людей, що отримували з метою діагностики або терапії препарати, до складу яких входять мишачі антитіла, може давати помилкові (підвищенні) значення.

8.6. Під час використання Набору для проведення декількох незалежних серій аналізів слід мати на увазі, що для кожного незалежного визначення необхідна побудова нового калібрувального графіка та використання контрольної сироватки.

8.7. Не використовуйте компоненти з інших наборів або із аналогічних наборів інших партій.

9. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1	Помістіть в рамку необхідну кількість стрипів –із розрахунку на кількість досліджуваних зразків в двох повторах та 14 лунок для калібрувальних проб та контрольної сироватки.
2	Розбавте зразки сироватки (плазми) крові в 101 раз, використовуючи Буфер для розведення зразків (SP160Z). Наприклад: 5 мкл зразка + 500 мкл Буфера для розведення зразків. Не розбавляйте калібрувальні проби та контрольну сироватку.
3	Якщо передбачувана концентрація анти-ТГлю IgG в досліджуваному зразку перевищує 200 Од/мл, його слід додатково розвести, використовуючи Буфер для розведення зразків (SP160Z). Використання інших буферів чи реагентів для розбавлення зразків може призвести до помилкових результатів. Примітка: в такому випадку для отримання надійних результатів рекомендуємо використовувати декілька послідовних розведень досліджуваного зразка сироватки (плазми) крові.
4	Внесіть у відповідні лунки в двох повторах по 100 мкл калібрувальної проби та контрольної сироватки. В лунки, що залишилися, внесіть в двох повторах по 100 мкл розбавлених досліджуваних зразків сироватки (плазми) крові. Внесення калібрувальних проб, контрольної сироватки та досліджуваних зразків, необхідно провести протягом 15 хв.
5	Обережно перемішайте вміст планшета круговими рухами на горизонтальній поверхні, заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета. Інкубуйте планшет протягом 30 хвилин при температурі +37°С.
6	Після закінчення інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 3 рази . При кожному відмиванні додавайте в усі лунки по 250 мкл розчину для відмивання (див. п. 7.3), струшуйте планшет круговими рухами по горизонтальній поверхні, а потім видаляйте рідину за допомогою вакууму або витрушуванням. По закінченні відмивання необхідно ретельно видалити залишки рідини з лунок на фільтрувальний папір.
7	Внесіть у всі лунки по 100 мкл кон'югату.
8	Заклейте планшет плівкою для заклеювання планшета та інкубуйте його протягом 30 хвилин при температурі +37 °С .
9	По закінченні інкубації видаліть вміст лунок і відмийте лунки 5 разів.
10	Внесіть у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину. Внесення розчину субстрату тетраметилбензидину в лунки необхідно провести протягом 2-3 хв. Інкубуйте планшет в темряві при кімнатній температурі (+18...+25°С) протягом 10–20 хвилин в залежності від швидкості розвитку синього забарвлення.
11	Внесіть в усі лунки з тією же швидкістю і у тій же послідовності, як і розчин субстрату тетраметилбензидину, по 100 мкл стоп-реагенту, при цьому вміст лунок забарвлюється в яскраво-жовтий колір.

Продовження таблиці на стор. 8

12	Визначте величину оптичної густини (ОГ) в лунках планшета за допомогою планшетного фотометра при довжині хвилі 450 нм. Вимірювання ОГ вмісту лунок планшета необхідно провести протягом 15 хв після внесення стоп-реагенту. Бланк фотометра виставляйте за калібрувальною пробую С1 або за повітрям.
13	Побудуйте в лінійних координатах калібрувальний графік: вісь абсцис (x) – концентрація анти-ТГлю IgG в калібрувальних пробах (Од/мл), вісь ординат (y) – оптична густина калібрувальних проб (ОГ 450 нм). Для алгоритму обчислення (апроксимації) калібрувального графіка використовуйте інтервальний (відрізково-лінійний, «від точки доточки») метод.
14	Визначте за калібрувальним графіком вміст анти-ТГлю IgG в досліджуваних зразках. У разі попереднього розведення досліджуваного зразка (див. п.3), отриманий результат необхідно домножити на фактор розведення.

Таблиця М

Вид матеріалу	Збір, зберігання та обробка матеріалу	Приклад розведення	Зразок в лунку, мкл	Фактор перерахунку
Сироватка (плазма) крові	Досліджувані зразки повинні бути ретельно відцентрифуговані. Аналіз гемолізованих, непрозорих зразків може привести до помилкових результатів.	5 мкл зразка + 500 мкл Буфера для розведення зразків	100	1

10. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ ТА НОРМИ

10.1. Ґрунтуючись на результатах досліджень, що проведені фахівцями ТОВ «ХЕМА», рекомендуємо скористатися нормами, наведеними нижче. Разом із тим, у відповідності до принципів GLP (Належної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна самостійно визначити параметри норми, які є характерними для обстежуваної популяції.

Примітка: значення концентрацій анти-ТГлю IgG в досліджуваних зразках, які знаходяться нижче межі чутливості Набору (1,0 Од/мл), а також перевищують значення верхньої калібрувальної проби (200 Од/мл) належить приводити в наступній формі: «в досліджуваному зразку X концентрація анти-ТГлю IgG нижча за 1,0 Од/мл» або «вища за 200 Од/мл».

Досліджувана група	Одиниці, Од/мл	
	Нижня межа	Верхня межа
Здорові донори	-	25.0

11. ЛІТЕРАТУРА

1. Chartrand LJ, Seidman EG. Celiac disease is a lifelong disorder. Clin. Invest. Med., Vol. 19, 357-361, 1996
2. Cornell HJ. Coeliac disease: A review of the causative agents and their possible mechanisms of action. Amino Acids, Vol. 10, 1-19, 1996
3. Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. Am.J Gastroenterol., Vol. 92, 210-2212, 1997
4. Jokinen J, Peters U, Maki M, Miettinen A, Collin P. Celiac sprue in patients with chronic oral ucosal symptoms. J Clin.Gastroenterol, Vol. 26, 23-26, 1998
5. Taminiu JA. Celiac disease. Curr.Opin.Pediatr., Vol. 8, 483-486, 1996
6. Williams CN. Celiac disease: past, present and future. Can.J Gastroenterol., Vol. 11, 647-649, 1997

З питань якості Набору «анти-Трансглютаміназа IgG-ІФА»

звертатися в ТОВ «ХЕМА» за адресою:

м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23

тел./факс: +38 (044) 422-62-16

email: info@xema.com.ua

www.xema-medica.com

Начальник відділу з контролю якості ТОВ «ХЕМА» Коваленко

Еліна Володимирівна

ДЛЯ НОТАТОК