ВЕКТОР БЕСТ

IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ

Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации иммуноглобулинов класса G к глиадину в сыворотке крови человека

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОР РЕАГЕНТОВ **D-3754**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ» предназначен для определения иммуноглобулинов класса G к глиадину в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа в клинических, диагностических и научно-исследовательских лабораториях.

1.2. Набор может быть использован для комплексной диагностики целиакии (глютеновой энтеропатии) и некоторых других заболеваний.

1.3. Комплектация набора позволяет проводить три независимые серии анализов (разборный планшет можно разделить на три произвольные части).

1.4. Набор рассчитан на проведение в дублях анализов 41 исследуемого, 5 калибровочных и 2 контрольных образцов или, при трех независимых постановках анализа, 27 исследуемых, 15 калибровочных и 6 контрольных образцов.

1.5. Целиакия – хроническое прогрессирующее заболевание, при котором поражается слизистая оболочка тонкого кишечника и происходит нарушение всасывания (синдром мальабсорбции). Целиакия развивается у генетически предрасположенных индивидов. Для клиники целиакии характерно развитие аутоиммунного процесса в отношении ткани слизистой, сопровождающееся дистрофическими изменениями гладкой мускулатуры кишечника, активацией спаечного процесса и рядом других местных и системных патологических реакций. Этиология целиакии до конца не выясне-

на, но установлено, что болезнь провоцируется употреблением в пищу глютен-содеращих продуктов из пшеницы, ржи, овса, ячменя и др. злаков.

В сыворотке крови, слюне и кишечном соке большинства нелеченных больных целиакией регистрируются антитела к белку глиадину (глютену пшеницы) – одному из основных белковых компонентов клейковины злаков. Единственным способом лечения целиакии является безглютеновая диета. Она постепенно нормализует уровни антиглиадиновых антител (АГА), ингибирует аутоиммунный процесс и улучшает состояние больного.

АГА являются наиболее ранними предикторами глютеновой интоксикации и в отличие от других серологических маркеров целиакии (антиретикулиновые и эндомизийные антитела, антитела к тканевой трансглутаминазе) появляются в ранней фазе заболевания.

Уровень АГА-IgA обычно повышен уже в самом начале заболевания. На фоне диеты и лечения он стабилизируется и уменьшается до нормы в течение 1–6 месяцев. АГА-IgG появляются позже, а при проведении адекватной терапии их уровень понижается гораздо медленнее (12 месяцев и более). В целом определение АГА-IgA более специфично, чем АГА-IgG, т.к. в большей мере отражает события, происходящие на слизистой тонкой кишки, однако из-за частой ассоциации целиакии с селективным иммунодефицитом IgA предпочтительнее определение обеих изотипов АГА.

В сыворотке крови практически здоровых взрослых людей антитела к глиадину обычно определяются в концентрации от 0 до 25 Ед/мл, у детей – от 0 до 12,5 Ед/мл. Уровни АГА обоих классов даже при отсутствии патологии ЖКТ могут быть повышены у родственников первой линии больных целиакией, что указывает на наследственную предрасположенность к заболеванию. Высокие концентрации АГА довольно часто встречаются в выборке пациентов с различными заболеваниями, ассоциированными с целиакией. В их клинике так или иначе проявляется повышенная реактивность иммунной системы в сочетании с фиброзами и другими патологическими изменениями в соединительной ткани (ревматоидный артрит, цирроз печени и др.), а также с разной степенью выраженности синдрома мальабсорбции (анемия, тяжелые гипоавитаминозы, атопия и др.). Окончательный диагноз «глютеновая энтеропатия» или «целиакия» – устанавливается на основании комплекса клинических, эндоскопических, серологических и гистологических данных с учетом генетической предрасположенности пациента.

Региональные нормальные уровни АГА могут различаться, поскольку они в значительной степени зависят от генетического и возрастного состава популяции, экологии, географических и национальных пищевых привычек, наличия местного селективного дефицита IgA. Поэтому, лабораториям на местах рекомендуется опреде-

лить свои собственные границы нормальных значений АГА-IgG и АГА-IgA.

В исследуемой нами случайной выборке здоровых доноров 25–45 лет из г. Новосибирска и г. Рубцовска (Алтайский край) сывороточные концентрации АГА обоих классов не превышали 25 Ед/мл.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. ПРИНЦИП МЕТОДА

Используемый твердофазный метод иммуноанализа основан на принципе «сэндвича». Анализ проводится в две стадии. На первой стадии калибровочные пробы с известной концентрацией АГА-IgG, а также анализируемые образцы инкубируются в лунках планшета с иммобилизованным очищенным глиадином пшеницы. Затем планшет отмывается. На второй стадии связавшиеся АГА обрабатывают пероксидазным конъюгатом антител против IgG человека. После отмывания избытка конъюгата, образовавшиеся иммунные комплексы «глиадин-АГА-конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). Интенсивность окраски хромогена пропорциональна концентрации АГА-IgG в анализируемом образце. После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом результаты учитываются фотометрически. Концентрацию IgG к глиадину в образцах определяют по калибровочному графику.

2.2. СОСТАВ НАБОРА

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным очищенным глиадином – 1 шт.;
- конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 фл., 1,5 мл;
- калибровочные пробы, содержащие 0; 12,5; 25; 50 и 100 Ед/мл АГА-IgG человека – 5 фл. по 0,7 мл;
- положительный контрольный образец ($К^+$) с концентрацией АГА-IgG (> 30 Ед/мл)– 1 фл., 0,7 мл;
- отрицательный контрольный образец ($К^-$) с концентрацией АГА-IgG (< 10 Ед/мл) – 1 фл., 0,7 мл;
- концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 фл., 28 мл;
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 2 фл. по 10 мл;
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 фл., 13 мл;
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) – 1 фл., 1 мл;
- стоп-реагент – 1 фл., 12 мл;
- пленка для заклеивания планшета – 2 шт.;
- пластиковая ванночка для реагентов – 2 шт.;
- наконечники для пипеток – 16 шт.;
- трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- инструкция по применению – 1 шт.;
- планшет для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

2.3. Концентрации АГА в калибровочных пробах и контрольных образцах даны в относительных единицах, поскольку международного стандарта антител к глиадину не существует. При калибровке использован набор реагентов «Anti-Gliadin IgG» фирмы ORGENTEC (Германия).

2.4. Продолжительность анализа – 1,5 ч.

3.АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Чувствительность анализа – 2,5 Ед/мл.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными.

Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сывороток крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные передавать возбудителей вирусных и бактериальных инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.7. Для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов ИФА.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- мерные цилиндры, колбы или стаканы для приготовления промывочного раствора;

- пипетки дозирующие, автоматические одно- и многоканальные со сменными наконечниками на 0,01–1,0 мл;
- пробирки или флаконы для приготовления и разведения проб или концентратов компонентов;
- термостат на (37±1)°С;
- спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета дли длине волны 450 нм; 620–655 нм;
- дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72);
- фильтровальная бумага;
- пластмассовые ванночки или чашки Петри для промывочного раствора и раствора конъюгата.

6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

6.1. Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

6.2. ПРАВИЛА РАБОТЫ ПРИ ДРОБНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НАБОРА

6.2.1. Растворы из флаконов отбирать только одноразовыми индивидуальными наконечниками для пипеток.

6.2.2. После отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение 1 месяца, но в пределах срока годности набора.

6.3. ПОДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух, плотно закрыть замок и поместить в холодильник.

Хранение: при температуре от 2 до 8°С в течение 1 месяца.

6.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОМЫВОЧНОГО РАСТВОРА

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата фосфатно-солевого буферного раствора с твином в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов отобрать в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при 30–40°С до полного растворения осадка.

Хранение: до 5 суток при 2–8°С.

6.5. КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ И КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Калибровочные пробы и контрольные образцы не требуют разведений и поставляются в готовом к использованию виде.

Таблица

Расход компонентов набора в зависимости от количества используемых стрипов

Количество стрипов	Промывочный раствор		Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор ТМБ	
	ФСБ-Т, концентрат, мл	Дистил. вода, мл	Конъюгат, концентрат, мл	РРК, мл	ТМБ, концентрат, мкл	СБР, мл
2	4,0	до 100	0,2	2,0	140	2,0
4	8,0	до 200	0,4	4,0	280	4,0
6	12,0	до 300	0,6	6,0	420	6,0
8	16,0	до 400	0,8	8,0	560	8,0
10	20,0	до 500	1,0	10,0	700	10,0
12	24,0	до 600	1,2	12,0	840	12,0

6.6. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА КОНЪЮГАТА

Предварительно концентрат конъюгата перемешать пипетированием.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в чистый флакон или пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество раствора для разведения конъюгата (РРК), добавить соответствующее количество концентрата конъюгата, тщательно перемешать.

Избегать образования пены!

Хранение: до 3 часов при 18–25°С.

6.7. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНА

Внимание! *Рекомендуется выделить наконечники для пипеток, которые использовать только для работы с тетраметилбензидином. Посуду и наконечники для пипетки, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду и наконечники ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) в отдельный чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента внести необходимое количество СБР, добавить соответствующее количество концентрата ТМБ, тщательно перемешать.

Хранение: не более 3 часов при 18–25°С в темноте.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

7.1. Для анализа используют сыворотку (плазму) крови человека. Срок хранения образцов – не более 72 ч при 2–8°С. При необходимости образцы можно длительное время хранить при минус 20°С. После размораживания их тщательно перемешивают, осадок отделяют центрифугированием. Тепловая обработка образцов не

рекомендуется, поскольку она часто приводит к снижению чувствительности. Для получения сравнимых результатов следует использовать образцы одного типа (сыворотка либо плазма).

7.2. Схема анализа набора «IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ» предусматривает разведение анализируемых образцов в 100 раз раствором для разведения сывороток. Разведение осуществляется в две стадии: сначала в 10 раз в отдельном планшете для предварительного разведения исследуемых образцов, а затем еще в 10 раз непосредственно в лунках стрипов для иммуноанализа. Альтернативный вариант – обе стадии разведения осуществляются в планшете для предварительного разведения исследуемых образцов.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Перед началом работы с набором «IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ» необходимо внимательно прочитать «Инструкцию по применению набора». В случае неточного выполнения требований инструкции не гарантируется достоверность получаемых результатов.

Во избежание контаминации калибровочные пробы и контрольные образцы следует отбирать из пробирок одноразовыми наконечниками. Необходимо до минимума сократить время нахождения флаконов с калибровочны-

ми и контрольными образцами при комнатной температуре и хранить их тщательно укупоренными.

Запрещается при работе с набором использовать один и тот же наконечник (наконечники) для раскапывания содержимого различных флаконов и анализируемых образцов. Каждую лунку стрипов можно использовать только один раз. При проведении каждой серии анализов обязательна постановка калибровочных образцов. Для повышения достоверности результатов постановку калибровочных и анализируемых образцов рекомендуется проводить в дублях, используя для каждого образца по две лунки.

8.1. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов, внести по 90 мкл РРС, а затем по 10 мкл предварительно разведенных в 10 раз анализируемых сывороток. Сразу после внесения образцов содержимое лунок перемешать пипетированием, 3–4 раза набирая и опорожняя наконечник пипетки, которым вносили образец*. В контрольные лунки внести по 100 мкл готовых калибровочных проб, $К^-$ и $К^+$.

Стрипы закрыть липкой пленкой и инкубировать 45 мин в термостате при 37°С.

---

* Рабочее разведение сывороток для анализа (т.е. в 100 раз) можно заранее приготовить в отдельной посуде, например, в планшете для предварительного разведения исследуемых образцов. Тогда готовые образцы вносят по 100 мкл в лунки стрипов для анализируемых образцов.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить в сосуд с дезинфицирующим раствором. Содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть планшет 5 раз промывочным раствором (п. 6.4.) с помощью промывочного устройства. При этом в каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе одного промывания. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо следить за полным опорожнением лунок после каждого цикла отмывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. В каждую лунку внести по 100 мкл рабочего раствора конъюгата (п. 6.6.), стрипы закрыть липкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин в термостате при 37.°С. После инкубации стрипы обработать, как описано в п. 8.2.

Внимание! *Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

8.4. Во все лунки стрипов внести по 100 мкл рабочего раствора ТМБ, приготовленного непосредственно перед использованием (п. 6.7.). Стрипы закрыть липкой пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 минут при 18–25°С.

Внимание! *Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.*

8.5. Во все лунки стрипов добавить по 100 мкл стоп-реагента.

9. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты ИФА регистрировать с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение оптической плотности на длине волны 450 нм. Измерение оптической плотности (ОП) проводят в один прием во всех использованных лунках планшета через 2–3 мин после остановки реакции. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

10. КРАТКАЯ СХЕМА ИФА.

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести:	по 100 мкл К$^+$, К$^-$ и калибровочных проб в контрольные лунки.
Внести:	по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов в лунки для исследуемых образцов.
Инкубировать:	45 мин, 37°С.
Промыть:	промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
Внести:	по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.
Инкубировать:	30 мин, 37°С.
Промыть:	промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.
Внести:	по 100 мкл рабочего раствора ТМБ.
Инкубировать:	15 мин, 18–25°С, в темноте.
Внести:	по 100 мкл стоп-реагента.
Измерить:	ОП при 450 нм / референсная длина волны 620–655 нм.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

11.1. По результатам измерения вычислить среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с анализируемыми образцами.

Среднее значение ОП в лунках с калибровочной пробой 0 Ед/мл АГА-IgG не должно быть выше 0,15 о.е.

Среднее значение ОП в лунках с калибровочной пробой 100 Ед/мл АГА-IgG должно быть не ниже 1,2 о.е.

11.2. Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации АГА-IgG (ось абсцисс) в калибровочных пробах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждой калибровочной пробы отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

11.3. Определить содержание концентраций АГА-IgG в контрольных образцах и анализируемых образцах по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить среднее значение ОП анализируемого образца. Провести прямую линию, параллельно оси абсцисс, до пересечения с калибровочным графиком. От точки пересечения опустить перпендикуляр на

ось абсцисс. По полученной точке пересечения определить значение концентрации АГА-IgG в образце.

11.4. Контрольные образцы служат для проверки правильности результатов. Полученные значения концентраций исследуемых образцов достоверны, если вычисленные по калибровочному графику значения концентраций АГА-IgG в контрольных образцах не выходят за пределы значений, указанных на этикетках флаконов.

При использовании для расчетов концентраций компьютерного или встроенного в спектрофотометр программного обеспечения в настройках выбрать метод, соответствующий кусочно-линейной аппроксимации.

11.5. При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации АГА-IgG в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

12. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

12.1. Набор реагентов «IgG-Глиадин – ИФА – БЕСТ» следует хранить и транспортировать в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается транспортирование набора при температуре до 25°С не более 10 сут.

Замораживание набора не допускается.

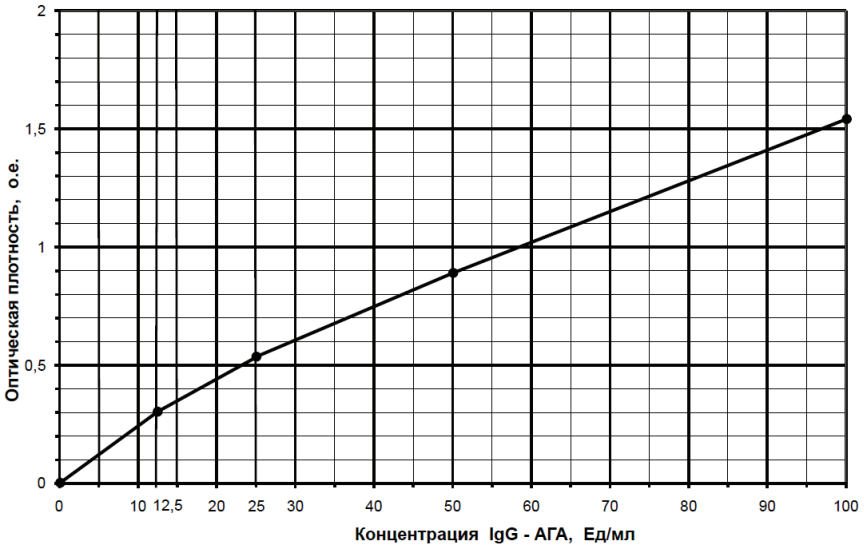

Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации АГА-IgG в калибровочных пробах.

12.2. Дробное использование набора может быть реализовано не позднее 1 мес с момента проведения первого иммуноферментного анализа, но в пределах срока годности. **В случае дробного использования набора** построение калибровочного графика и определение концентрации АГА-IgG в контрольных образцах необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

12.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах ЗАО «Вектор-Бест».

Запрещается использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

12.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

13. ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова М.Л. Новый алгоритм диагностики целиакии. //Лабораторная медицина, 2002, №5, с. 31–38.
2. Эмануэль В.Л., Вахмянина Н.В., Ревнова М.О. Лабораторная диагностика целиакии.//Иммунология, 2000, с. 37–40.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов,
следует обращаться
в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл.,
Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 336-73-46,
тел./факс (383) 332-67-49,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

За справками и консультацией обращаться:
в отделение иммунохимии,

тел. (383) 336-77-97

15.09.10.

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ВЕКТОР-БЕСТ»

Федеральная лицензия № 99-04-000086
на производство, хранение и реализацию
лекарственных средств

КРУПНЕЙШИЙ В РОССИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЬ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ДИАГНОСТИКУМОВ

Вирусные гепатиты A, B, C, D
Инфекции, передаваемые
половым путем
ВИЧ-инфекция
TORCH-инфекции
Клещевой энцефалит
Паразитарные болезни
Диагностика беременности
Лабораторное оборудование

Стабильное качество
и точный результат
для Вашей лаборатории!

Наш адрес: 630117, Новосибирск-117, а/я 492
Тел./факс: (383) 227-73-60 (многоканальный)
Тел.: (383) 332-37-10, 332-37-58, 332-36-34,
332-67-49, 332-67-52
E-mail: vbmarket@vector-best.ru
Internet: www.vector-best.ru