

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусанов
_____ 201__г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации иммуноглобулинов класса G к глиадину в сыворотке крови человека
(IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Глиадин (глютен пшеницы) – один из основных белковых компонентов клейковины злаков, который вызывает поражение слизистой тонкого кишечника и развитие синдрома мальабсорбции у генетически предрасположенных индивидов. Антитела к глиадину определяются в сыворотке крови, слюне и кишечном соке у большинства нелеченных больных глютеневой энтеропатией (целиакией). Антиглиадиновые антитела являются наиболее ранними предикторами глютеневой интоксикации и в отличие от других серологических маркеров целиакии (антиретикулиновые и эндомизийные антитела, антитела к тканевой трансглутаминазе) появляются в ранней фазе заболевания.

1.3. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 5 калибровочных образцов и 2 проб контрольных образцов (всего 96 определений при использовании всех стрипов планшета) или 27 неизвестных, 15 калибровочных образцов и 6 проб контрольных образцов (при трех независимых постановках анализа).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: зам. директора НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, ст. научным сотрудником НИИ СД С.Е. Гладковой.

Метод определения основан на двухстадийном «сэндвич» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. Анализ проводят в две стадии. На первой стадии калибровочные образцы с известными концентрациями иммуноглобулинов класса G к глиадину и исследуемые образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок глиадином. Затем планшет отмывают. На второй стадии связавшиеся в лунках антитела класса G к глиадину обрабатывают конъюгатом антител против IgG человека с пероксидазой хрена. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «глиадин – иммуноглобулины класса G к глиадину – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-регентом измеряют оптическую плотность растворов в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–650 нм.

Степень окраски пропорциональна концентрации антител класса G к глиадину в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация иммуноглобулинов класса G к глиадину в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилучевых стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности очищенным глиадином, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочные образцы, аттестованные относительно набора реагентов «Anti-Gliadin IgG» (фирма Orgentec Diagnostika GmbH, Германия), содержащие известные количества антител класса G к глиадину (АГА-IgG) – 0; 12,5; 25; 50; 100 Ед/мл – 5 флаконов (по 0,7 мл);
- положительный контрольный образец (K1) с концентрацией АГА-IgG 30-50 Ед/мл, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- отрицательный контрольный образец (K2) с концентрацией АГА-IgG 3-10 Ед/мл, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- конъюгат антител к IgG человека с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,5 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-T×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 флакон (13,0 мл);
- раствор для разведения сывороток (РРС) – 2 флакона (по 12,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);

- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл);

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 2 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.;
- планшетами для предварительного разведения исследуемых образцов – 1 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции глиадина с сывороточным альбумином, гемоглобином и иммуноглобулинами (IgG, IgM, IgA) человека.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания АГА-IgG в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора IgG – Глиадин – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Отклонение от расчетной величины концентраций АГА-IgG в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой крови, не содержащей АГА-IgG, не превышает 10 % в диапазоне концентраций: 25 - 100 Ед/мл.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации АГА-IgG, предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов положительного контрольного образца (К1) и калибровочного образца 25 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация АГА-IgG не превышает 2,5 Ед/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций.

При использовании набора IgG – Глиадин – ИФА – БЕСТ хук-эффект не обнаружен.

3.7. Клиническая проверка. Концентрация АГА-IgG, измеренная в сыворотке крови у 500 условно здоровых доноров 20-50 лет из г. Новосибирска и г. Рубцовска (Алтайский край) не превышала 20 Ед/мл.

3.8. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации АГА-IgG, соответствующие нормальным у здоровых людей для данного региона.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (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 поражённый 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 образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

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

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

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 100 мл;

– колбы вместимостью 1000 мл;

- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку крови.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 2 до 8°C не более 3 сут или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре от 18 до 25 °C. Тепловая обработка образцов не рекомендуется.

Для получения сравнимых результатов следует использовать образцы одного типа (сыворотка или плазма крови).

6.4. Исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (PPC). Для этого, используя планшет для предварительного разведения образцов, к 90 мкл PPC добавить 10 мкл цельной сыворотки, тщательно перемешать.

Приготовленные 10-тикратно разведенные сыворотки можно хранить не более 3 ч при температуре от 18 до 25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре от 18 до 25 °C в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 1 месяца.

7.3. Приготовление промывочного буферного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре от 30 до 40 °C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный промывочного буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольных образцов

Калибровочные и контрольные образцы готовы к использованию и не требуют дополнительных разведений.

После отбора части содержимого тщательно закупоренные флаконы хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес.

7.5. Приготовление раствора конъюгата

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

Использовать в течение 3 часов после приготовления.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Приготовление раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5-10 мин до окончания инкубации! Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Количество стрипов	Раствор конъюгата		Раствор тетраметилбензидина		Промывочный буферный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	0,2	2,0	0,14	2,0	4,0	до 100
4	0,4	4,0	0,28	4,0	8,0	до 200
6	0,6	6,0	0,42	6,0	12,0	до 300
8	0,8	8,0	0,56	8,0	16,0	до 400
10	1,0	10,0	0,70	10,0	20,0	до 500
12	1,2	12,0	0,84	12,0	24,0	до 600

7.7. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждого из калибровочных и контрольных образцов. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов, внести 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных анализируемых образцов (п. 6.4). Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

7.8. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 45 мин в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.9. По окончании инкубации содержимое лунок удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл промывочного буферного раствора (см п. 7.3), с последующей аспирацией. Процесс промывки повторить 5 раз. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.10. Внести во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата (п. 7.5).

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин в термостате при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

7.11. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки, как указано в п. 7.9.

7.12. Внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6). Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25°C .

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.13. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации АГА-IgG в калибровочных образцах (Ед/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации иммуноглобулинов класса G к глиадину в контрольных образцах.

9.2. Определить содержание иммуноглобулинов класса G к глиадину в контрольных образцах и анализируемых пробах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация АГА-IgG в анализируемом образце сыворотки крови превышает 100 Ед/мл, образец следует дополнительно развести раствором для разведения сывороток (РРС) (в 2, 4, 8 раз), повторить анализ и полученный результат умножить на величину дополнительного разведения.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре от 2 до 8 °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.3. 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:

- неиспользованные стрипы можно хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8 °С в течение 1 месяца;

- калибровочные и контрольные образцы после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес;

- концентраты конъюгата и тетраметилбензидина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С не более 1 мес;

- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор для разведения конъюгата, субстратный буферный раствор и

стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности;

– раствор конъюгата можно хранить при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;

– рабочий буферный раствор можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 3 сут;

– раствор тетраметилбензидина можно хранить в защищенном от света месте при температуре от 18 до 25 °С не более 3 ч;

– построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации иммуноглобулинов класса G к глиадину в контрольных образцах.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

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

По вопросам, касающимся качества набора IgG-Глиадин-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Ст. научный сотрудник НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

С.Е. Гладкова

Зам. директора НИИ СД
ЗАО «Вектор-Бест»

М.Ю. Рукавишников

Зам. директора по научной работе Московского
Областного Научно-исследовательского Медицинского
института им. М.Ф.Владимирского (ОМНИИ)



В.И. Шумский