

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ХЕМА»

Ю. С. Лебедин

2016 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для иммуноферментного определения
IgG антител к дезаминированным пептидам глиадина (ДПГ) в сыворотке (плазме) крови
«антиДПГ-IgG-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ.

1.1. Набор реагентов «антиДПГ-IgG-ИФА» предназначен для количественного определения содержания IgG антител к дезаминированным пептидам глиадина (ДПГ) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Целиакия или глютен-чувствительная энтеропатия - хроническое заболевание, при котором нарушается кишечное всасывание в результате поражения слизистой тонкого кишечника. Точная этиология целиакии неизвестна, но установлено, что глиадин - спирторастворимая фракция глютена злаков - при данном заболевании является токсическим веществом. У подавляющего большинства нелеченых больных целиакией выявляются высокие концентрации IgG и IgA антител к дезаминированным пептидам глиадина в сыворотке (плазме) крови, слюне и кишечном соке. После исключения глютена из рациона уровень этих антител постепенно нормализуется. Для окончательного подтверждения диагноза целиакии используется биопсия слизистой в области перехода двенадцатиперстной кишки в тонкую. В этом месте характерные поражения («плоская» слизистая) выявляются и при тяжелой, и при умеренно выраженной целиакии.

Определение IgG и IgA антител к дезаминированным пептидам глиадина позволяет быстро и экономично определить показания для проведения кишечной биопсии.

Определение антител к дезаминированным пептидам глиадина может быть маркером дополнительной специфичности, используемых вместе с определением антител к глиадину. Патогенез целиакии сопровождается дезаминированием глиадина, поступившего с пищей, под действием тканевой трансглутаминазы. Дезаминированные пептиды глиадина (ДПГ) связываются с HLA молекулами на поверхности антиген презентирующих клеток и распознаются Т-хэлперами, что приводит к появлению в сыворотке антител к ДПГ. Таким образом, определение аутоантител к ДПГ может служить вспомогательным диагностическим маркером, используемым вместе с определением аутоантител к общему глиадину.

1.3. Диагностическая значимость определения.

Серийное определение IgG антител к дезаминированным пептидам глиадина является методом выбора для слежения за соблюдением и эффективностью безглиадиновой (безглютеновой) диеты у больных с доказанной целиакией, выявляемых методом

иммуноферментного анализа.

1.4. Область применения - клиническая лабораторная диагностика.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.

2.1. Принцип работы Набора. Определение концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок иммобилизован высокоочищенный антиген - дезаминированные пептиды глиаина. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.

В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в анализируемом образце.

Концентрацию IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в анализируемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в калибровочных пробах.

2.2. Состав Набора:

- **планшет** 96-луночный полистироловый стрипированный, с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок ДПП - 1 шт.;
- **калибровочные пробы** на основе фосфатного буфера, содержащие известные количества IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина - 0; 5; 10; 25; 50 и 100 Ед/мл; концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в калибровочных пробах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках флаконов, готовы к использованию - 6 пробирок (по 1,5 мл каждая);
- **конъюгат**, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **ИФА-Буфер** (pH 7,0 - 7,2), готов к использованию - 1 флакон (50 мл);
- **раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ)**, готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **контрольная сыворотка** на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина, готова к использованию - 1 пробирка (1,5 мл);
- **концентрат отмывочного раствора** 21-кратный концентрат - 1 флакон (22 мл);
- **стоп-реагент**; готов к использованию - 1 флакон (11 мл);
- **липкая лента** с бумажной подложкой для заклеивания планшета; готова к использованию - 2 шт.;
- **аналитический паспорт**;
- **Инструкция по применению Набора.**

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ.

3.1. Специфичность Использование в Наборе высокоочищенного препарата дезаминированные пептиды гиадина для иммобилизации в лунках планшета позволяет достичь высокой специфичности определения.

3.2. Чувствительность Минимальная достоверно определяемая Набором «антиДПГ-IgG-ИФА» концентрация IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина не превышает 5,0 Ед/мл.

3.3. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «антиДПГ-IgG-ИФА» не превышает 8,0%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина - соответствие измеренной концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 10 Ед/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Линейность. Зависимость концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 5 - 100 Ед/мл и составляет $\pm 10\%$.

3.6. Клиническая проверка. Нормальные значения.

Концентрация IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина в сыворотке (плазме) здоровых у людей не превышает 10 Ед/мл.

В соответствии с требованиями *GLP* (*Good Laboratory Practice*, Хорошая Лабораторная Практика) рекомендуется в каждой клинко-диагностической лаборатории при использовании Набора реагентов уточнить значения концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам гиадина, соответствующие нормальным у обследуемого контингента.

3.7. Интерференция. Изучение образцов плазмы с различными антикоагулянтами показало, что такие антикоагулянты как ЭДТА, гепарин и цитрат натрия не приводят к матричному эффекту.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

4.1. Потенциальный риск применения Набора по ГОСТ 31508–2012 «Изделия медицинские. Классификация в зависимости от потенциального риска применения. Общие требования» и Номенклатурной классификации медицинских изделий, утв. Приказом Минздрава Российской Федерации от № 4н от 6 июня 2012 года (в ред. Приказа Минздрава России от 25.09.2014 N 557н) – класс 2а.

4.2. Все компоненты Набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

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

4.5. Меры предосторожности-соблюдение *«Правил 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).

4.6. **Медицинские отходы класса Б.** Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения». Медицинское изделие при необходимости утилизируется в соответствии с санитарными правилами и нормами СанПиН 2.1.7.2790 по классу Б эпидемиологически опасные отходы.

4.7. Утилизация проводится специализированными организациями, которые имеют лицензию на право утилизации медицинских отходов.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- **фотометр вертикального сканирования**, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- **термостат**, поддерживающий температуру $+ 37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$;
- **дозаторы** со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости в диапазоне 0,5-250 мкл;
- **цилиндр мерный** вместимостью 500 мл;
- **вода дистиллированная**;
- **перчатки** резиновые или пластиковые;
- **бумага** фильтровальная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

6.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки

(плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18-25 °C) не менее 30 мин.

6.2. Образцы сыворотки (плазмы) крови, используемые для анализа, допускается хранить при температуре +2-8 °C не более 24 ч или при температуре минус 20 °C не более 2 недель.

6.3. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированные, мутные образцы сыворотки (плазмы) крови, а также исследуемые образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

6.4. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших для диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

6.5. При использовании Набора реагентов для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в контрольной сыворотке.

6.6. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, необходимо тщательно заклеить липкой лентой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре +2-8 °C в течение всего срока годности Набора.

6.7. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1объем концентрата + 20 объемов дистиллированной воды).

Приготовленный отмывочный раствор допускается хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 2 сут. или при температуре +2-8 °C не более 10 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

7.1. Развести исследуемые образцы сывороток (плазм) в 101 раз, используя ИФА-Буфер. Тщательно перемешать, избегая вспенивания.

Калибровочные пробы и контрольную сыворотку не разводить.

7.2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови.

Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки, анализируемых проб необходимо произвести в течение 5-10 мин.

7.3. Аккуратно перемешать содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при комнатной температуре (+18-25 °C).

7.4. По окончании инкубации удалить содержимое лунок отсасыванием (с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки 3 раза. При каждой промывке добавить во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора, встряхнуть планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

7.5. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата.

7.6. Заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 30 мин при комнатной температуре (+18-25 °C).

7.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и промыть лунки планшета 5 раз путем добавления во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора.

7.8. Внести во все лунки планшета по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ). Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) в лунки планшета необходимо произвести в течение 2-3 мин.

Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18-25 °C) в течение 10-20 мин в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7.9. Внести во все лунки планшета с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), по 100 мкл стоп-реагента; при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.

Внесение стоп-реагента в лунки планшета необходимо произвести в течение 1-2 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

8.1. Измерить величину оптической плотности (ОП) в лунках планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП растворов в лунках планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ.

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс - концентрация IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в калибровочных пробах (Ед/мл), ось ординат - оптическая плотность калибровочных проб (ОП₄₅₀).

9.2. Определить по калибровочному графику содержание IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в анализируемых пробах. Если концентрация IgG антител к дезаминированным пептидам глиаина в исследуемом образце сыворотки (плазмы) превышает 100 Ед/мл, его следует развести ИФА-Буфером и полученный результат умножить на разведение.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

10.1. Набор реагентов «антиДПП-IgG-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение Набора при температуре до $+25^{\circ}\text{C}$ не более 5 сут.

Транспортирование Наборов должно производиться всеми видами крытого транспорта с соблюдением условий и требований, установленных для данного вида транспорта, при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$. Допускается транспортирование Наборов при температуре до 25°C не более 5 сут.

10.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестных образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки - всего 96 определений при использовании всего комплекта стрипов.

10.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- вскрытые стрипы следует использовать в течение 1 ч, длительному хранению не подлежат;

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить в упаковке при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

- ИФА-Буфер, конъюгат, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) и стоп-реагент после вскрытия флаконов можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора;

- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия пробирок можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 1 мес; при необходимости более длительного хранения - при температуре -20°C и ниже в течение всего срока годности;

- приготовленный отмывочный раствор можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 5 суток или при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 30 суток;

- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

10.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

По вопросам, касающимся качества Набора реагентов «антиДПП-IgG-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу: 105264, Москва, ул. 9-ая Парковая, д. 48, к. 4, тел/факс (495) 7370040.

Руководитель исследовательского
отдела ООО «ХЕМА» _____ к. б. н. Д. С. Кострикин
М.П.



«СОГЛАСОВАНО»

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» _____ Варнавичус П.К.

16 ИЮН 2016

«__» _____ 2016 г.

М.П.



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 8 ЛИСТОВ
« 16 ИЮН 2016 » 201__ год



Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

П.К. Варнавичус