«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«28» сентября 2022 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для иммуноферментного определения концентрации иммуноглобулинов класса А
к глиадину в сыворотке крови
(IgA-Глиадин – ИФА – БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации иммуноглобулинов класса А к глиадину в сыворотке крови «IgA-Глиадин-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для определения концентрации иммуноглобулинов класса А к глиадину в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

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 А к глиадину и исследуемые образцы инкубируют в лунках с иммобилизованным на внутренней поверхности лунок глиадином. После отмывки, на второй стадии анализа, связавшиеся в лунках антитела к глиадину обрабатывают конъюгатом антител против IgA человека с пероксидазой хрена. После отмывания избытка конъюгата образовавшиеся иммунные комплексы «глиадин – иммуноглобулины класса А к глиадину – конъюгат» выявляют ферментативной реакцией пероксидазы с перекисью водорода в присутствии хромогена (тетраметилбензидина). После остановки пероксидазной реакции стоп-реагентом измеряют оптическую плотность раст-воров в лунках на основной длине волны 450 нм при референсной длине волны 620–655 нм.

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

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованным на внутренней поверхности очищенным глиадином, готовый для использования – 1 шт.;
- * калибровочные образцы, содержащие известные количества антител класса А к глиадину (АГА-IgA) – 0; 12,5; 25; 50; 100 Ед/мл, готовые для использования – 5 флаконов (по 0,7 мл);
- * положительный контрольный образец (К1) с концентрацией АГА-IgA 30–50 Ед/мл, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);
- * отрицательный контрольный образец (К2) с концентрацией АГА-IgA 3–10 Ед/мл, готовый для использования – 1 флакон (0,7 мл);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– конъюгат антител к IgA человека с пероксидазой хрена, готовый для использования – 1 фл. (13 мл);
– концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
– раствор для разведения сывороток (РРС), готовый для использования – 2 флакона (по 10,0 мл);
– раствор тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс), готовый для использования – 1 фл. (13 мл);
– стоп-реагент, готовый для использования – 1 флакон (12 мл);
– планшет для предварительного разведения исследуемых образцов (12 восьмилуночных стрипов), готовый для использования – 1 шт.

Принадлежности:
– пленки для заклеивания планшета – 2 шт.;
– трафарет для построения калибровочного графика – 1 шт.;
– ванночки для реагентов – 2 шт.;
– наконечники для дозаторов на 4–200 мкл– 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1.* Коэффициент вариации результатов определений концентрации АГА-IgA в лунках, содержащих контрольный образец, не превышает 8%.

3.2.* Линейность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «линейность» – отклонение от расчетной величины концентрации АГА-IgA при разведении калибровочных образцов, содержащих 100, 50 и 25 Ед/мл антител класса А к глиадину (АГА-IgA), в 2 раза. Процент «линейности» составляет 90–110%.

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

3.4.* Чувствительность. Минимально определяемая концентрация антител класса А к глиадину (АГА-IgA), рассчитанная на основании среднего арифметического значения оптической плотности калибровочного образца B_0 плюс 2σ (σ – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения B_0), не превышает 1,0 Ед/мл.

3.5. Клиническая проверка. При исследовании нормального диапазона значений антител к глиадину класса А концентрация АГА-IgA, измеренная у здоровых доноров (n=500) не превышала 25 Ед/мл.

3.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации АГА-IgA, соответствующие нормальным у здоровых людей для данного региона

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

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 исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и в методических указаниях МУ 287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утв. департаментом госсанэпиднадзора
Минздрава РФ от 30.12.1998).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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 посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе ЧАС, спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (H_2O_2, деохлор, хлорамин), приводит к серьезному искажению результатов.

4.8. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) 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».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- спектрофотометр вертикального сканирования, поз-воляющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм; допускается измерение только при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1)°С;
- холодильник бытовой;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- дозаторы полуавтоматические многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 4 до 200 мкл;
- промывочное устройство для планшетов
- флаконы стеклянные вместимостью 15 мл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки медицинские диагностические одноразовые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа используется сыворотка крови.

6.2. При проведении анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови.

6.3. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре от 18 до 25°С не более 3 часов, от 2 до 8°С не более 3 суток или при температуре (–20)°С не более 3 мес.

Следует избегать многократного замораживания/оттаивания, так как это может привести к получению неправильных результатов. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сывороток крови, содержащие осадок или взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 2000–2500 об/мин в течение 10 мин при температуре от 18 до 25°С.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа все компоненты набора следует выдержать при температуре от 18 до 25°С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками, поместить в холодильник и хранить при 2–8°С в течение срока годности набора.

7.2. Подготовка планшета с иммобилизованным глиадином

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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.

Хранить при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора.

7.3. Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор приготовить разведением исходного концентрата ФСБ-Т×25 в 25 раз. Для этого в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов набора реагентов) внести 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 температуре от 30 до 40°С до полного растворения осадка.

Хранение: промывочный раствор хранить при температуре (2–8)°С не более 1 месяца или при температуре (2–8)°С не более 7 суток.

7.4. Приготовление калибровочных и контрольных образцов

Калибровочные и контрольные образцы готовы для использования и не требуют дополнительного разведения.

7.5. Подготовка исследуемых образцов

Для анализа исследуемые сыворотки развести в 10 раз раствором для разведения сывороток (РРС). Для этого, используя планшет для предварительного разведения исследуемых образцов, к 90 мкл РРС добавить 10 мкл сыворотки, тщательно перемешать.

Приготовленные 10-ти кратно разведенные сыворотки можно хранить не более 4 ч при температуре от 2 до 8°С.

7.6. Подготовка конъюгата

Конъюгат готов для использования.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

Утилизировать конъюгат, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом).***

7.7. Подготовка раствора тетраметилбензидина плюс (раствор ТМБ плюс)

Раствор ТМБ плюс готов для использования.

Исключить воздействие прямого света на раствор тетраметилбензидина плюс. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ плюс в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента

Утилизировать раствор ТМБ плюс, оставшийся во флаконе или ванночке для реагента после проведения ИФА ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ плюс).***

Внимание! *Для работы с раствором ТМБ плюс необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для раствора ТМБ плюс, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ плюс в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно отмыть дистиллированной водой.*

7.8. Стоп-реагент готов для использования.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

8.1. Внести в соответствующие лунки планшета (п.7.2) в дублях по 100 мкл каждого из калибровочных и контрольных образцов. В лунки, предназначенные для анализируемых образцов, внести

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.5). Таким образом, исследуемый образец в лунке разбавляется в 100 раз.

Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.

8.2. Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 45 мин в термостате при температуре 37±1°С.

8.3. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. *Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.* По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.4. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (п. 7.6).

Для внесения конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

Стрипы заклеить липкой пленкой и инкубировать в течение 30 мин в термостате при температуре 37±1°С.

8.5. По окончании второй инкубации содержимое лунок удалить и промыть лунки, как указано в п. 8.3.

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ плюс (п. 7.7).

Для внесения раствора ТМБ плюс использовать ванночку для реагента и одноразовые наконечники, входящие в состав набора.

Стрипы инкубировать в защищенном от света месте в течение 15 мин при температуре от 18 до 25°С.

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

8.8. Измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–655 нм. Допускается измерение при длине волны только 450 нм.

Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости среднего арифметического значения оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации АГА-IgA в калибровочных образцах (Ед/мл). Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

9.2. Определить содержание иммуноглобулинов класса А к глиадину в контрольных образцах и анализируемых пробах по калибровочному графику. Значения концентрации IgA к глиадину в контрольных образцах должно попадать в пределы, указанные на этикетках флаконов.

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

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре от 2 до 8°С. Допускается транспортирование при температуре до 25°С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Дробное использование набора может быть реализовано в течение всего срока годности набора. В случае дробного использования набора:

– неиспользованные стрипы планшета разборного с иммобилизованным глиадином хранить в плотно закрытом пакете при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– калибровочные и контрольный образцы, конъюгат, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, раствор для разведения сывороток, раствор ТМБ плюс и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить в плотно закрытых флаконах при температуре от 2 до 8°С в течение всего срока годности набора;
– неиспользованные стрипы планшета для предварительного разведения исследуемых образцов хранить в закрытом пакете при температуре от 2 до 30°С в течение всего срока годности набора;
– промывочный раствор хранить при температуре (2–8)°С не более 1 месяца или при температуре (18–25)°С не более 7 суток.

10.5. Построение калибровочного графика и определение концентрации иммуноглобулинов класса А к глиадину в контрольных образцах необходимо проводить для каждого независимого эксперимента.

10.6. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (раствор ТМБ плюс, ФСБ-Т×25, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

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

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

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

630559, Новосибирская область,
Новосибирский район, п. Кольцово,
а/я 121, тел. (383) 227-67-64,
E-mail: vbobtk@vector-best.ru

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ

Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом.

Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

Все реагенты наборов, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

Не применять набор реагентов по назначению после окончания срока годности.

HBsAg и антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С отсутствуют.

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

1. Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

– не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут менять ферментативную активность конъюгатов;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– ферментативная реакция чувствительна к присутствию ионов металлов, поэтому не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

– избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

– рабочие поверхности столов, оборудования обрабатывайте 70% этиловым спиртом (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

– никогда не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

– перед отбором ТМБ из флакона необходимо обрабатывать конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70% этиловым спиртом, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона с ТМБ;

– если допущена ошибка при внесении в лунку анализируемых образцов, нельзя, опорожнив эту лунку, вносить в нее новый образец; такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

– Для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство.

– Не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов.

– Добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки. Недостаточная аспирация жидкости в процессе промывки может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа.

– Следите за состоянием промывочного устройства – регулярно (1 раз в неделю) обрабатывайте шланги и емкости 70% этиловым спиртом.

– Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

2. Условия правильности работы набора

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

– соотношение оптических плотностей калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_{12,5} < ОП_{25} < ОП_{50} < ОП_{100}$;

– $ОП_{100} \geq 0,9$ ед. опт. плотн. (о.е.);

– $ОП_0 \leq 0,15$ о.е.;

– вычисленные по калибровочному графику значения концентраций специфических АГА-IgA в контрольных образцах не выходят за пределы значений, указанных на этикетках флаконов.

$ОП_0$, $ОП_{12,5}$, $ОП_{25}$, $ОП_{50}$ и $ОП_{100}$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0; 12,5; 25, 50 и 100 Ед/мл соответственно.

3. Расчет результатов анализа

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

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации АГА-IgA (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого на прилагаемом трафарете для построения графика против концентрации каждого калибровочного образца отложить соответствующее ей среднее значение оптической плотности. Последовательно соединить полученные точки отрезками прямых линий.

Пример калибровочного графика представлен на рисунке.

Определить концентрацию АГА-IgA 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-IgA в образце.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

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

4. Диагностическая значимость

Глиадин (фракция глютена пшеницы) и подобные ему белки других злаковых (прежде всего, ржи и ячменя) богаты пролином, который относительно устойчив к отщеплению пептидазами кишечника. Из-за этого отщепление единичных аминокислот от пептидной цепочки останавливается на пролине, что приводит к накоплению в просвете тонкой кишки различных пептидов глиадина с пролином на концах. Некоторые из этих пептидов обладают умеренным токсическим (для энтероцитов) или раздражающим действием на эпителий кишечника, некоторые способны проникать в энтероцит и вызывать высвобождение зонулина, стимулирующего ослабление или разрушение зоны плотного контакта между энтероцитами, а некоторые имеют повышенную иммуногенность и обладают иммуномодулирующим действием. У здорового человека часть «пролиновых» пептидов так и удаляется из пищеварительного тракта без изменений, а другая часть все-таки расщепляется эндогенными и экзогенными (кишечная микрофлора) ферментами до аминокислот. Однако, при наличии в тонком кишечнике (ТК) очагов воспалительных заболеваний (любой этиологии!), при которых обычно в той или иной мере нарушается и барьерная функция слизистой, пептиды глиадина, и др. молекулы из просвета кишки проникают в подслизистую ТК, где формируются условия для возникновения иммунного конфликта, усугубляющего клинические симптомы местного воспаления и способного создать целый ряд проблем на уровне целого организма (нарушение толерантности к определенным компонентам пищи, различные нарушения работы кишечника, дерматиты, аллергические и аутоиммунные реакции, метаболические нарушения и т. д.). Сам глиадин также способствует увеличению проницаемости слизистой, поскольку, как уже упоминалось, некоторые из его пролиновых пептидов могут активировать высвобождение зонулина, контролирующего стабильность плотного контакта между энтероцитами. Этот процесс опосредуется специфическим рецептором CXCR3, а количество этого рецептора на энтероцитах по-видимому обусловлено генетически.

Пептиды глиадина, имеющие в своем составе глутамин, в подслизистой и в зоне ослабленного межклеточного пространства могут стать мишенью для тканевой трансглутаминазы-2 (tTG-2), которая превращает глутамин в глутаминовую кислоту, а пептиды глиадина – в дезамидированные пептиды глиадина. При этом весьма существенно возрастает их иммуногенность, поскольку изменение структуры пептида ведет к более активному представлению этого антигена дендритными (и др. антигенпрезентующими) клетками Т-хелперам и некоторым др. иммунокомпетентым клеткам. Появляются цитотоксические клетки (в основном, спец. лимфоциты), объектом атаки которых становятся в частности энтероциты, нарастает продукция АТ к дезамидированному глиадину и глиадину, формируется очаг иммунного воспаления.

При нарушении всасывания и барьерной функции слизистой ТК помимо иммунной сенсибилизации к глиадину возрастает и сенсибилизация к др. экзогенным (компоненты пищи, кишечные микроорганизмы) и некоторым эндогенным белкам и пептидам (аутоиммунизация), которые оказались в подслизистом слое ТК в зоне хронического воспаления. При этом могут сформироваться предпосылки для возникновения системных аутоиммунных заболеваний. Так, аутоиммунная сенсибилизация к tTG-2 и др. АГ эндомизия, а также ретикулина – неотъемлемый и специфический признак клинически сформировавшейся целиакии (Ц) – тяжелого системного заболевания, провоцируемого употреблением в пищу глиадин-содержащих продуктов. Наиболее специфичными для диагностики Ц считаются АТ к tTG-2. Вероятно, при Ц пул таких АТ формируется из-за частого возникновения и достаточно долгого персистирования комплекса «глиадиновый пептид-tTG-2», который воспринимается иммунной системой как чужеродный и нехарактерный для внутренней среды организма. В результате возникают многочисленные очаги иммунного поражения не только слизистой кишки, но и др. тканей (соединительной ткани, поджел железы и т. д.), поскольку антитела к аутоантигенам и иммуноэффекторные клетки свободно мигрируют в организме.

Тем не менее, эта апоплексическая картина в тяжелом варианте на практике реализуется достаточно редко, потому что эффективное представление антигена дезамидированного пептида глиадина осуществляется при участии определенных молекул комплекса гистосовместимости HLA (MHC II класса), наличие или отсутствие которых у индивида предопределено генетически. Если генетиче-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ской предрасположенности нет, то такие очаги иммунного воспаления на слизистой обычно спонтанно локализуются и затухают или поддаются адекватному лечению без перехода в Ц.

Целиакия (Ц) позиционируется как системное генетически опосредованное заболевание, провоцируемое употреблением в пищу глютен-содержащих продуктов, и при котором поражается слизистая оболочка тонкого кишечника и происходит нарушение всасывания (синдром мальабсорбции). Для клиники Ц характерно развитие аутоиммунного процесса в отношении ткани слизистой, сопровождающееся атрофией ворсинок (с апоптозом энтероцитов) и дистрофическими изменениями гладкой мускулатуры кишечника, активацией спаечного процесса и рядом других местных и системных патологических реакций. К настоящему времени выделяют 4 основные формы Ц:

1. Типичная, которая проявляется патологиями со стороны ЖКТ
2. Нетипичная, когда нарушения со стороны ЖКТ минимальны или отсутствуют, но есть симптомы со стороны других систем и органов
3. Вялотекущая, если обнаруживаются повреждения слизистой оболочки тонкого кишечника и выявляются аутоантитела, но клинических проявлений нет
4. Скрытая, в этом случае, у генетически предрасположенных лиц, определяются аутоантитела, но морфология слизистой тонкого кишечника в норме. Симптомы заболевания могут либо проявляться, либо отсутствовать

Из-за большого количества разнообразных клинических проявлений существует необходимость обследовать пациентов не только с очевидными желудочно-кишечными симптомами, но также и лиц с т. н. «болезнями, ассоциированными с Ц» (заболевания соединительной ткани, анемия, повышенная утомляемость, дистрофия, дерматиты, ухудшение репродуктивной функции, неврологические нарушения, аутоиммунный тиреоидит и др.).

Как известно, выявление АТ к глиадину (АГА) – это чувствительный, но не достаточно специфичный тест для Ц, поскольку синтез АГА может быть инициирован целым рядом энтеропатий с нарушением барьерной функции слизистой кишечника. Существенно специфичнее для Ц тест на выявление АТ к дезамидированным пептидам глиадина, однако факта наличия у пациента таких АТ тоже недостаточно для положительного диагноза, поскольку процесс дезамидирования не обязательно связан с Ц. По современным понятиям, оба этих теста (особенно, первый) несмотря на чувствительность могут играть в диагностике собственно Ц лишь вспомогательную роль.

От других энтеропатий тонкого кишечника Ц отличается гл. образом наличием аутоантител к основному аутоантигену – тканевой трансглутаминазе (tTG-2) на фоне употребления глютен-содержащих продуктов. Поэтому определение уровней IgA к tTG-2 в сыворотке крови является тестом «первого выбора» при подозрении на целиакию (Ц). Выявление же антител класса А к антигену кишечного эндомизия (ЕМА) и HLA-типирование являются важными дополнительными и также достаточно высокоспецифичными методами диагностики (Ц). Они используются, например, в случаях, когда есть определенная клиника и наследственная предрасположенность, но результат при определении антител к tTG-2 сомнителен. Если результаты измерения уровней IgA к tTG-2 и IgA к ЕМА отрицательны, рекомендуется определение антител к общему глиадину или к дезамидированным пептидам глиадина. При этом положительный результат подтвердит наличие иммунного конфликта с глиадином, но связан ли он с Ц, либо обусловлен другими механизмами нарушения всасывания или пищевой непереносимости глютена все равно будет не ясно. Результаты серологических тестов, должны далее подтверждаться результатами дуоденальных биопсий (наличие характерных для Ц гистологических изменений). В любом случае, высокие уровни АГА в крови требуют дополнительного обследования и, возможно, лечения с определенными пищевыми ограничениями.

Известно, что для Ц строгая пожизненная безглютеновая диета в настоящее время является единственным надежным методом лечения. На фоне диеты улучшается самочувствие, притупляется и исчезает симптоматика, падают уровни аутоантител и, особенно, антител к глиадину. Это происходит со всеми пациентами, хотя и с весьма заметными индивидуальными отличиями. Поскольку при нарушении диеты все непременно вернется, врачу (и пациенту!) необходим эффективный метод контроля соблюдения диеты и выявления ее скрытых погрешностей. Таким надежным и достаточно дешевым методом является мониторинг в крови уровней IgG- и IgA-антител к общему глиадину.

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).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Определение антител класса IgA к глиадину, tTG, EMA более специфично, чем определение антител класса IgG к перечисленной группе антигенов, т.к. в большей мере отражает события, происходящие на слизистой тонкой кишки. Однако из-за частой ассоциации Ц с селективным иммунодефицитом IgA все-таки предпочтительнее определение специфических иммуноглобулинов обоих классов.

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 (при использовании наборов АО Вектор-Бест). Высокие концентрации АГА довольно обычны и в выборке пациентов с различными заболеваниями, про которые известно, что они часто бывают ассоциированными с Ц. В их клинике так или иначе проявляется повышенная реактивность иммунной системы в сочетании с воспалением и фиброзами кишечника (болезнь Крона) 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.

5. Краткая схема проведения ИФА для набора реагентов «IgA-Глиадин-ИФА-БЕСТ»

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!

Внести: по 100 мкл К1, К2 и калибровочных образцов 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 конъюгата.

Инкубировать: 30 мин, 37°С.

Промыть: промывочным раствором, 350 мкл, 5 раз.

Внести: по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

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.

6. Графические символы

REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
Σ/n	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов		Не стерильно
LOT	Код партии		Температурный диапазон
	Изготовитель		Дата изготовления
	Использовать до ...		Обратитесь к инструкции по применению
	Осторожно! Обратитесь к Инструкции по применению	YYYY-MM-DD YYYY-MM	Дата в формате Год-Месяц-День Год-Месяц

Консультацию специалиста по работе с набором можно получить по тел.: (383) 363-05-97.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

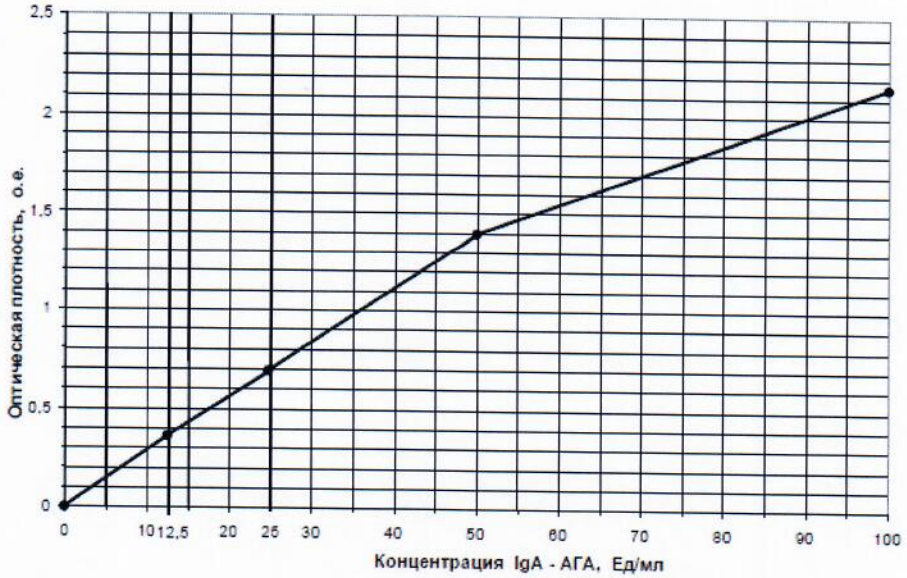


Рис. Пример зависимости оптической плотности от концентрации АГА-IgA в калибровочных образцах.

Таблица расхода компонентов

Кол-во используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ плюс, мл
	ФСБ-Т×25, концентрат, мл	Дистил. вода, мл		
2	4,0	по 100	2,0	2,0
3	6,0	по 150	3,0	3,0
4	8,0	по 200	4,0	4,0
5	10,0	по 350	5,0	5,0
6	12,0	по 300	6,0	6,0
7	14,0	по 350	7,0	7,0
8	16,0	по 400	8,0	8,0
9	18,0	по 450	9,0	9,0
10	20,0	по 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

* Концентрация АГА-IgA в калибровочных и контрольных образцах даны в относительных единицах (Ед/мл), т.к. международного стандарта антител к глиадину не существует. Калибровочные и контрольные образцы набора реагентов «IgA-Глиадин-ИФА-БЕСТ» калибровались по стандартам коммерческого иммуноферментного набора реагентов «Anti-Gliadin IgA» (фирма «ORGENTEC Diagnostika GmbH»,
РУ№ ФСЗ 2012/11754, Германия)

* по ГОСТ Р 51352-2013.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru