

НАБОР

ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ КЛАССА IgG К АМА-M2, Sp100, gp210, SLA/LP, LKM-1, LC1, F-АКТИНУ, АКТИНИНУ И ТРОПОМИОЗИНУ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА НА МЕМБРАНЕ

ORG 722, Liver-9-Line 2nd Generation

Каталог. № : **ORG 722**
Количество : **96**
Производитель: **Orgentec (Германия)**

Методика от **01-2014**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Liver-9-Line 2-го поколения - набор, основанный на методе иммуноблота на мембране, для полуколичественного определения аутоантител класса IgG к АМА-M2, Sp100, gp210, SLA/LP, LKM-1, LC1, F-Актину, Актину и Тропомиозину в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен только для профессионального использования в *in-vitro* диагностике.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Обнаружение аутоантител играет ключевую роль в диагностике заболеваний печени, а именно вариантов аутоиммунного гепатита (АИГ), первичного билиарного цирроза (ПБЦ), и первичного склерозирующего холангита (ПСХ) у взрослых и детей. Аутоиммунный гепатит (АИГ) - это хроническое заболевание печени неясной этиологии. АИГ встречается очень редко (приблизительно от 50 до 200 больных на 1 миллион). Типичными для данного заболевания являются повышенный уровень трансаминаз, гипергаммаглобулинемия и повышенные титры антиядерных антител (ANA) и/или антител к гладкой мускулатуре (SMA). Гистологически выявляются признаки перипортального гепатита и инфильтрация портальной зоны лимфоидными клетками. Заболевания встречается во всех возрастных группах, как у мужчин, так и у женщин, хотя женщины болеют чаще. При отсутствии лечения это заболевание прогрессирует до цирроза и/или варикоза вен пищевода. В этом случае смертность высокая. АИГ часто развивается бессимптомно. Пациенты отмечают тошноту, постоянную усталость и боль в суставах и мышцах. Также могут присутствовать симптомы хронического заболевания печени, вплоть до/и включая цирроз печени.

У большой части пациентов это заболевание часто диагностируется на бессимптомной стадии, в процессе обследования при увеличенном объеме печени. Так как прогноз значительно улучшается при своевременном лечении, то большое значение имеет ранняя диагностика аутоиммунного гепатита. Основываясь на различии выявляемых аутоантител, различают тип 1 АИГ (АИГ-1) и тип 2 АИГ (АИГ-2). В то время как АИГ-1 встречается во всех возрастных группах, АИГ-2 обычно диагностируется в молодом возрасте и у детей. АИГ-2 составляет только небольшую часть всех случаев АИГ, но очень быстро прогрессирует.

Метод Liver-9-Line 2-го поколения ORGENTEC представляет собой иммуноблот, и предназначен для серологического исследования с целью выявления аутоиммунных заболеваний печени. Одновременное определение аутоантител к семи различным антигенам делает возможной дифференциальную диагностику АИГ и исключение других заболеваний печени.

АМА-M2

Антимитохондриальные антитела (АМА - это гетерогенная группа аутоантител, направленных к различным белкам внутренней и внешней сторон митохондриальной мембраны. АМА подтипа M2 направлены к эпитопам комплекса пируват дегидрогеназы. Высокая чувствительность и специфичность аутоантител M2 делает их прекрасным инструментом для выявления первичного билиарного цирроза (РВС). АМА определяются в 90-95% случаев у больных РВС; выявление значительно повышенного титра АМА (>

1:40 методом непрямой иммунофлуоресценции) - это достоверный признак РВС. АМА также определяются у примерно 25% больных АИГ, хотя в этих случаях титры обычно низкие.

(Продолжение см. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые антигены АМА-M2, sp100, gp210, SLA/LP, LKM, LC1, F-Актина, Актина и Тропомиозина, а также три контрольных антигена для CO Cut-off контроля, ЕС Контроля Ферментного Конъюгата и SC Сывороточного Контроля иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в сыворотке или плазме, связываются с мембраной. При промывке с мембранных стрипов удаляются неспецифические компоненты сыворотки или плазмы. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к IgG человека, иммунологически выявляет связавшиеся антитела, присутствовавшие в сыворотке или плазме пациентов, образуя комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизует с образованием нерастворимого сине-фиолетового продукта. При промывке с мембранных стрипов удаляется не гидролизовавшийся субстрат. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.



ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), используемый в компонентах, был протестирован на BSE и найден отрицательным.
- Избегайте контакта с субстратом ТМБ (3,3',5,5'-Тетраметилбензидином).
- Буфер для образцов и промывочный буфер содержат азид натрия 0,09% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.
- Ферментный конъюгат содержит ProClin 300 0.05% в качестве консерванта. Эта концентрация классифицируется как неопасная.

Во время работы с реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правила лабораторной безопасности и надлежащей лабораторной практики:

- Меры первой помощи: при попадании на кожу, немедленно тщательно промыть водой с мылом. Снять загрязненную одежду и обувь и выстирать ее перед использованием. Если системная жидкость соприкасается с кожей, тщательно промойте водой. После контакта с глазами тщательно промойте глаза с приоткрытыми веками проточной водой в течение не менее 10 минут. Обратитесь к врачу, если это необходимо.
- Меры личной безопасности, защитное снаряжение и чрезвычайные меры:

Соблюдать правила безопасности лабораторий. Избегать контакта с кожей и глазами. Не глотать. Не пипетировать ртом. Не есть, не пить, не курить, не наносить макияж в местах работы с реагентами. При проливаннии вытереть инертным материалом и выбросить в соответствующую емкость для утилизации отходов.

- Средства индивидуальной защиты: Использовать защитные перчатки из нитрил каучука или натурального латекса.

Пользуйтесь защитными очками.

- Неблагоприятные условия: Так как раствор субстрата является светочувствительным, хранить Alegria® полоски в темноте.
- При утилизации лабораторных отходов национальное или региональное законодательство должно соблюдаться.

Соблюдайте рекомендации по обеспечению контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенных сывороток.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ

- Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
- Дайте возможность крови сгуститься и отделите сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.

- Образцы должны храниться при 2-8 °С до 5 дней или при –20 °С до шести месяцев.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной теплом сыворотки.

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

ORG 722-16	Достаточно для проведения 16 анализов
ORG 722-08	Достаточно для проведения 8 анализов
Тестовые полоски 1x/2x	8 нитроцеллюлозных полосок, покрытых антигеном. Готовы к использованию. 1 калибровочная полоска, предварительно подготовленная (кодируется CAL), для полуколичественной оценки. Готова к использованию.
1 x 20 мл	Буфер для образцов PB, содержащий PBS, BSA, моющее средство, консервант азид натрия 0,09%, желтый. Готов к использованию.
1 x 20 мл	Ферментный конъюгат, содержащий анти-человеческие антитела IgG, меченные щелочной фосфатазой; PBS, BSA, моющее средство, консервант ProClin 0,05%, светло-красный. Готов к использованию.
1 x 20 мл	Промывочный буфер WB, содержащий Трис, моющее средство, консервант азид натрия 0,09%; 50 x концентрат.
1x/2x 10 мл	BCIP субстрат; содержащий BCIP/NBT. Готов к использованию.
	Инкубационный лоток
1	Инструкция по применению: ELISA Mini-DVD
1	Сертификат анализа

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Пипетки на 10 мкл и 1000 мкл
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Мерный цилиндр на 1000 мл
- Таймер
- Платформа качающаяся
- Пинцет

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить тестовый набор при 2-8 °С.
- Хранить нитроцеллюлозные полоски тщательно запечатанными в оригинальной пластиковой упаковке с осушителем.
- Важно: Калибровочная полоска очень светочувствительна. Хранить в темноте!
- Не подвергать реагенты воздействию тепла, солнца или яркого света во время хранения и использования.
- Срок хранения нераспечатанного набора составляет 18 месяцев от даты производства. Смотреть этикетки для отдельной партии.
- Разведенный Промывочный буфер стабилен в течение по крайней мере 30 дней при хранении при температуре 2-8 °С. После передачи в контейнер реагента, мы рекомендуем использовать его в тот же день.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

- Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
- Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- Все материалы должны быть при комнатной температуре (20-28 °С).
- Все реагенты и образцы должны быть готовы к использованию перед началом тестирования. Для получения наиболее надежных и воспроизводимых результатов анализ должен проводиться без каких-либо изменений или остановок между этапами.
- Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов, приведенную в этой инструкции.
- Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов.
- Для избегания перекрестной контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей.
- Необходимо точно соблюдать время всех инкубаций.
- Контрольные сыворотки или пулы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.
- С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
- Убедитесь, что на стрипе во время инкубации нет пузырьков воздуха. Наличие пузырьков может привести к неравномерному окрашиванию бендов и неправильной интерпретации результатов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Буфер для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием.

Растворитель

Готов к использованию.

Подготовка образцов

Разведение образцов – см. процедуру тестирования. Эффективное разведение во время испытания составляет 1: 101.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Осторожно вставьте одну нитроцеллюлозную полоску с помощью пинцета в инкубационную камеру:

- Добавьте **1000 мкл буфера для образцов** в каждую камеру.
- Позвольте системе уравновеситься в течение 5 минут при медленном покачивании.
- Добавьте **10 мкл сыворотки пациента** прямо в инкубационную камеру.
- Инкубируйте в течение **60 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Осторожно полностью удалите разведенный раствор из камеры.
- Добавьте 2000 мкл Промывочного буфера в камеру, инкубируйте в течение 5 минут.
- Удалите промывочный буфер полностью. Повторите эту процедуру дважды.

- Добавьте **1000 мкл Ферментного конъюгата** в каждую инкубационную камеру.
- Инкубируйте в течение **30 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Полностью удалите раствор конъюгата из камеры.
- Добавьте 2000 мкл Промывочного буфера в камеру, инкубируйте в течение 5 минут.
- Удалите промывочный буфер полностью. Повторите эту процедуру дважды.

- Добавьте **1000 мкл субстрата** в каждую инкубационную камеру.
- Инкубируйте в течение **10 минут** в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
- Полностью удалите субстрат из камеры.
- Добавьте 1000 мкл дистиллированной воды в камеру, инкубируйте в течение 5 минут.
- Удалите промывочный буфер полностью. Повторите эту процедуру дважды.

Осторожно просушите стрипы промакиванием на бумажном полотенце. Позвольте стрипам полностью высохнуть на воздухе перед оценкой результатов.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Тест достоверен при условии, что Сывороточный контроль (первая полоса), Контроль конъюгата (вторая полоса) и Cut-Off контроль (третья полоса) изменили цвет в пределах реактивной полосы. Если эти критерии не выполнены, результат недействителен и анализ необходимо повторить.

Примечание: Пограничные образцы следует повторить или проверить с помощью альтернативной процедуры. Образцы от пациентов с диагнозом аутоиммунных заболеваний часто показывают несколько специфичных аутоантител. Такие образцы могут показать положительную реакцию с более чем одним антигеном.

Расчет результатов

Интенсивность сине-фиолетовой линии в позиции нанесенного антигена прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствующих в образце.

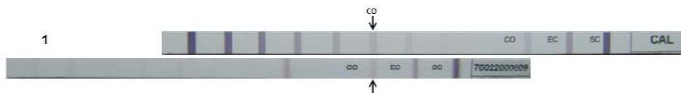
Полуколичественная оценка полоски образца:

отрицательный	интенсивность линии образца пациента слабее интенсивности СО-линии
пограничный	интенсивность линии образца пациента эквивалентна интенсивности СО-линии
слабый положительный	интенсивность линии образца пациента до 1 уровня сильнее интенсивности СО-линии

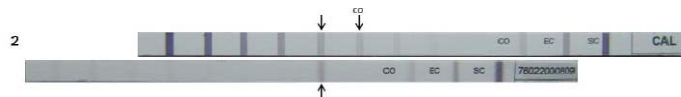
положительный	интенсивность линии образца пациента до 2 уровней сильнее интенсивности СО-линии
сильно положительный	интенсивность линии образца пациента ≥ 3 уровней сильнее, чем интенсивность СО-линии

Интерпретация интенсивности сине-фиолетовых линий:

- Сравнить интенсивность СО-линии полоски образца с интенсивностью линий калибровочной полосы.
Пример:



- Сравнить интенсивность линии образца пациента с интенсивностью линий калибровочной полоски.
Пример: Интерпретация интенсивности линии образца пациента "слабая положительная"



ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Калибровка

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота Liver-9-Line 2-го поколения оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

Диапазон измерения

Оценка интенсивности синих линий, описанных выше, позволяет провести полуколичественное определение аутоантител класса IgG в образце, протестированном в количественных диапазонах:

отрицательный, пограничный, слабый положительный, положительный, сильный положительный.

Ожидаемые значения

В нормальном диапазоне исследования с образцами от здоровых доноров крови следующие диапазоны были установлены в этом анализе. Cut-off: пограничное значение

Интерпретация результатов

Нормальный: отрицательный

Повышенный: слабоположительный, положительный, сильно положительный

Линейность

Образцы пациентов, содержащих высокие уровни специфических антител, серийно разводили в буфере для образцов. Активность каждого шага разбавления определяли с использованием калибровочной полосы.

Linearity				
Sample	Dilution	Observed	Expected	O/E
1	1:100	strong positive	strong positive	PASS
.	1:200	positive	positive	PASS
.	1:400	weak positive	weak positive	PASS
.	1:800	borderline	borderline	PASS
.	1:1600	negative	negative	PASS
2	1:100	strong positive	strong positive	PASS
.	1:200	positive	positive	PASS
.	1:400	weak positive	weak positive	PASS
.	1:800	borderline	borderline	PASS
.	1:1600	negative	negative	PASS

Чувствительность

Этот анализ иммуноблоттинга является полуколичественным методом анализа. Любая реактивность меньше граничной считается отрицательной.

Воспроизводимость

Внутри тестовая точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов из результатов 24 определений в одном анализе. Результаты для точности в пределах анализа приведены в таблице ниже.

Межсерийная точность: Коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого из трех образцов по результатам 6 определений в 5 различных анализах. Результаты для выполнения к запуску точности приведены в таблице ниже.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean	Result	Sample	Mean	Result
1	negative	PASS	1	negative	PASS
2	weak	PASS	2	weak	PASS
3	positive	PASS	3	positive	PASS

Перекрестно реагирующие вещества

Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом или липемией.

Результаты исследований

Study population	n	n_pos	%
Autoimmune hepatitis AIH	59	51	86.4
Primary biliary cirrhosis PBC	21	21	100.0
PBC overlap syndrome	9	9	100.0
Rheumatoid Arthritis RA	25	2	8.0
SLE	19	0	0.0
Thrombosis	16	1	6.3
Normal human sera	59	0	0.0

Clinical Diagnosis	Clinical Diagnosis		n
	Pos	Neg	
ORG 722	81	3	218
Liver-9-Line 2nd Generation	8	126	
	89	129	
Sensitivity:	91.0	%	
Specificity:	97.7	%	
Overall agreement:	95.0	%	

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Этот анализ предназначен в качестве диагностической помощи. Определенный клинический диагноз не должен основываться на результатах одного теста, он должен быть сделан врачом после всех оценки всех клинических и лабораторных исследований. Также каждое решение для терапии следует принимать индивидуально.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- Вставьте **блот-стрип** в инкубационную камеру.
 - ➔ Добавьте **1000 мкл** Разбавляющего буфера для образцов в инкубационную камеру.
 - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **5 минут**.
- Добавьте **10 мкл** сыворотки пациента и ресуспендируйте.
 - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **60 минут**.
 - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 2000 мкл** Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.
- Добавьте **1000 мкл** Ферментного конъюгата на стрип.
 - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **30 минут**.
 - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 2000 мкл** Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.
- Добавьте **1000 мкл** Субстрата на стрип
 - ➔ Инкубируйте с перемешиванием в течение **10 минут**
 - ➔ Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут 1000 мкл** дистиллированной воды, высушите блот-стрип.

Считайте результаты только после полного высыхания стрипа.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 123

e-mail: info@diameb.ua

www.diameb.com

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»