



НАБОР ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К КЕРАТИНУ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ МЕТОДОМ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Кат. №: 1122
Производитель: Immco Diagnostics

Методика от 06-2009

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для определения и количественного анализа антител к кератину в человеческой сыворотке (АКА) методом непрямой иммунофлуоресценции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ (См. оригинал инструкции).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе непрямой иммунофлуоресценции, оптимально подготовленные препараты ткани, поставляемые с набором, инкубируют с образцами сывороток пациентов, позволяя антителам связываться с субстратом. Все несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляют при промывке. Связавшиеся антитела класса IgG выявляют, инкубируя субстрат с конъюгат-мечеными флуоресцентной меткой (FITC) антителами к IgG человека. Результат реакции наблюдают с помощью флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующими фильтрами⁷. Присутствие АКА демонстрируется флуоресценцией зеленого цвета. Титры затем определяются тестированием серийных разведений.

РЕАГЕНТЫ

Хранение и подготовка

Храните все реагенты при 2-8 °С. Реагенты готовы к использованию после достижения комнатной температуры.

Реагенты, поставляемые в наборе

Набор содержит достаточное количество реагентов, необходимых для проведения 48 определений.

6 x 8-луночных слайдов с тканью пищевода крысы

1x0.5 мл Положительный контроль. Содержит человеческую сыворотку с BSA.

1x0.5 мл Отрицательный контроль. Содержит человеческую сыворотку с BSA.

1 x 5.0 мл Конъюгат антител к IgG человека с флуоресцентной меткой (FITC). Содержит BSA. Хранить в защищенном от света месте.

1 x 60 мл Буфер для разведения. Содержит BSA.

2 пробирки PBS. Растворить содержимое каждой в 1 литре.

1 x 5.0 мл Закрывающая среда. **Не замораживать!**

1 x 1.0 мл Краситель.

12 x Покровных стекол.

*Внимание – реагенты содержат <0.1% NaN₃

Необходимые, но не поставляемые материалы и оборудование

- Флуоресцентный микроскоп
- Микропипетки или пастеровские пипетки
- Серологические пипетки
- Емкости для окрашивания (например, сосуд Коплина)
- Небольшие пробирки (например, 13 x 75 мм) и подставка для них
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Контейнер емкостью 1 литр
- Бутыль для хранения Буфера для промывок
- Фильтровальная бумага
- Инкубационная камера

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HTLV-I, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно

опасным материалом. Следуйте правилам техники безопасности, установленным в вашей лаборатории для работы, хранения и утилизации потенциально опасного биологического материала.

ВНИМАНИЕ: Азид натрия (NaN₃) способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. Если азид натрия попал внутрь, необходимо сразу же сказать об этом руководителю лаборатории или в центр контроля за ядами.

Необходимо в точности следовать настоящей инструкции, это является необходимым условием получения точных достоверных результатов. Не смешивайте и не меняйте компоненты различных наборов, даже если они имеют одинаковый каталожный номер. Для предотвращения микробного или перекрестного загрязнения при работе с реагентами следуйте правилам, установленным в вашей лаборатории. Не используйте набор после истечения срока годности, указанного на этикетке упаковки.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ

Данный метод предназначен только для анализа образцов сыворотки. Гемолиз, липемия или микробное загрязнение влияют на качество проводимого анализа, поэтому такие образцы нельзя использовать для исследований.

Образцы могут храниться перед анализом при температуре 2-8 °С в течение одной недели. Если образцы будут проанализированы позже, их необходимо заморозить при -20°С.

Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Тестовый метод

А. Скрининг:

1. Разведите каждый образец сыворотки пациента в соотношении **1:10** буфером для разведения (0.1 мл сыворотки + 0.9 мл буфера для разведения). **Не разводите Положительный и отрицательный контроли!** Сохраните не разведенную сыворотку для того, чтобы иметь возможность определить титр антител, если скрининговый тест даст положительный результат.
2. Позвольте пакету, содержащему слайды, достичь комнатной температуры в течение 10-15 минут, а затем вскройте его и аккуратно достаньте слайд(ы), не прикасаясь к субстрату.
3. Пометьте слайды и поместите их в инкубационную камеру, содержащую фильтровальную бумагу, смоченную в воде, для предотвращения высыхания субстрата.
4. Переверните флакон с капельницей и аккуратно нанесите 1 каплю (примерно 50 мкл) Отрицательного контроля в лунку № 1. Действуя аналогично, нанесите 1 каплю Положительного контроля в лунку № 2. Избегайте переполнения лунок.
5. Используя микропипетки или пастеровские пипетки, нанесите по одной капле разведенных образцов сывороток пациентов (приблизительно по 50 мкл) в соответствующие лунки.
6. Поместите крышку на инкубационную камеру и инкубируйте слайды в течение 30 минут при комнатной температуре.
7. Достаньте слайды из инкубационной камеры и аккуратно промойте в примерно 10 мл PBS, используя пипетку или бутылку для промывок. Направляйте струю PBS вдоль середины слайда.
8. Прижмите край слайда к фильтровальной бумаге для удаления излишков PBS. Поместите слайды в инкубационную камеру. Немедленно переверните флакон с капельницей, содержащей конъюгат, и нанесите каплю (приблизительно 50 мкл) в каждую лунку.
9. Повторите **Шаг 7** и **Шаг 8** для каждого слайда.
10. Поместите крышку на инкубационную камеру и инкубируйте слайды в течение 30 минут при комнатной температуре.
11. Достаньте слайд из камеры. Держа слайд за матовую сторону, погрузите его в стакан, содержащий PBS, для удаления избытка конъюгата. Перенесите слайд в сосуд Коплина или другую емкость, наполненную PBS, на 10 минут. Повторите для остальных слайдов. **ВНИМАНИЕ:** недостаточная или неправильная промывка ведет к увеличению фонового окрашивания.
12. Достаньте слайды из емкости. Промокните край слайда о фильтровальную бумагу для удаления избытка PBS. **Для предотвращения высыхания слайда переходите немедленно к шагу 13, пока слайд еще влажный.**
13. Закройте слайд покровным стеклом. Нанесите 3 капли Закрывающей среды, равномерно распределяя их на покровном

стекле, и переверните слайд на покровное стекло. Для удаления пузырьков аккуратно надавите вдоль краев покровного стекла. Избегайте сдвига покровного стекла.

14. Повторите **Шаг 12** и **Шаг 13** для каждого слайда.
15. Оцените специфическую флуоресценцию с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении **200x** или более. Слайды могут быть оценены немедленно после приготовления. Кроме того, благодаря присутствию антифедингового агента в заключающей среде не наблюдается значительного снижения интенсивности окрашивания даже если оценка будет произведена позднее. Готовые слайды должны храниться в темноте при температуре 2-8°C.

В: Титрование (Определение конечной точки)

Сыворотка, показавшая положительный результат при скрининговом тестировании, может быть изучена еще раз для определения титра, следуя с шага 5 до шага 13. Каждая постановка должна включать соответствующие положительные и отрицательные контроли. Сделайте серийные двукратные разведения, начиная с разведения в соотношении 1:10. Титром является величина, обратная максимальному разведению сыворотки, еще дающему положительный результат.

Приготовление серийного разведения

Пронумеруйте пробирки от 1 до 6. Внесите 0.9 мл буфера для разведения в пробирку № 1 и по 0.2 мл буфера для разведения в пробирке с номерами 2 - 6. Внесите 0.1 мл не разведенной сыворотки в пробирку 1 и тщательно перемешайте. Перенесите 0.2 мл раствора из пробирки 1 в пробирку 2 и тщательно перемешайте. Продолжайте переносить по 0.2 мл раствора из одной пробирки в следующую, после тщательного перемешивания, для получения разведений, как это показано на рисунке ниже:

Пробирки	1	2	3	4	5	6
Сыворотка	0.1 мл					
	+					
Буферный разбавитель	0.9 мл	0.2 мл				
		→	→	→	→	→
Переместить		0.2 мл				
Конечное разведение	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320 и т.д.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Положительный и Отрицательный контроли должны анализироваться в каждой постановке. Отрицательный контроль должен показывать отсутствие специфического окрашивания, тогда как положительный контроль должен иметь интенсивность окрашивания 2+ или более. Если ожидаемые результаты не получены, постановка считается недействительной и анализ должен быть повторен. Если неадекватные результаты для контролей повторяются, то возможны следующие причины:

- Перекрестное загрязнение в результате несоответствующего хранения или работы с реагентами. Если наблюдаются следы контаминации, такие как мутность, такой контроль должен быть выброшен и использован другой контроль.
- Проблемы с оптической системой или флуоресцентным микроскопом. Это могут быть: несоответствующие настройки, использование ламп за пределами ожидаемых характеристик. и т.д.
- Высыхание слайдов во время процедуры анализа.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты тестирования на АКА должны быть оценены как отрицательные (<10), положительные (выше или равно 320), или положительные с соответствующим титром.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

В некоторых случаях сыворотки, положительные по антителам к АКА, могут либо давать очень слабый результат, либо отрицательный результат на начальном этапе в скрининговом разведении (эффект прозоны). В подобных сомнительных результатах сыворотка должна быть протестирована в более высоком разведении, и, если она окажется положительной, должен быть определен титр антител. Два или более типа аутоантител в сыворотке могут реагировать с клетками ткани пищевода крысы, приводя к интерференции при их определении и корректной идентификации методом иммуно-флуоресценции. Это может приводить к ошибке выявления АКА или к супрессии их титра, если влияющие антитела имеют более высокий титр.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Специфичность:	99%
Чувствительность:	44%
Положительное предположительное значение:	43%

(Таблицу и рисунок см. в оригинале инструкции).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: www.diameb.ua

www.biotechlab-s.com.ua