

НАБІР НЕПРЯМОГО ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛІЗУ

ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АУТОАНТИТІЛ ПРОТИ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ КЛІТИН (АМА), КЛІТИН ГЛАДКИХ М'ЯЗІВ (ASMA), МІКРОСОМАЛЬНИХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ, НИРОК (LKM) АБО ЦИРКУЛЮЮЧИХ ПАРІЄТАЛЬНИХ КЛІТИН (APCA)

517.050, AESKUSLIDES – Rodent Tissues

Каталог. №: 517.050

Кількість : 50

Виробник : AESKU. Diagnostics, (Німеччина)

Методика від 28-01-2014

Версія 011



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Тканини гризунів (щур/миша/LK/LKS)

Стандартне посилання	Опис	Кількість тестів	Інші посилання
517.050	rLKS – щур, загорнутий (5 лунок)	50	У тому числі демо посилання: xxx.Demo
517.101	rLKS – щур, загорнутий (10 лунок)	100	
517.051	rLKS – щур, відокремлені (5 лунок)	50	
517.100	rLKS – щур, відокремлені (10 лунок)	100	
518.050	mLKS – миша, відокремлені (5 лунок)	50	
518.100	mLKS – миша, відокремлені (10 лунок)	100	
55.050	rKS – щур, відокремлені (5 лунок)	50	
56.050	mKS – миша, відокремлені (5 лунок)	50	
56.100	mKS – миша, відокремлені (10 лунок)	100	

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набори **AESKUSLIDES** з вищевказаними номерами є непрямими імунофлуоресцентними аналізами для виявлення аутоантитіл проти, наприклад, мітохондріальних клітин (АМА), клітин гладких м'язів (ASMA), мікросомальних клітин печінки, нирок (LKM) або циркулюючих парієтальних клітин (APCA) в сироватці крові людини.

2. КЛІНІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Аутоімунні захворювання викликаються порушенням клітинної та/або гуморальної імунологічної реакції. Ці реакції, які зазвичай відбуваються під зовнішнім впливом, можуть при певних обставинах обернутися проти самого тіла і тим самим викликати різні захворювання.

ANA: Наявність антиядерних антитіл може виявлено в кожному наданому зразку тканини за допомогою позитивної ядерної флуоресценції. Крім того, не рекомендується використовувати флуоресценцію для скринінгу зразків ANA, оскільки клітини HEp-2 є більш чутливими, що дозволяє виявлення декількох різних типів моделей.

АМА: Анти-мітохондріальні антитіла (АМА) переважно реагують з внутрішньою мембраною мітохондрій (багатих на фосфоліпіди). АМА в основному присутні з такими захворюваннями, як первинний біліарний цироз печінки, псевдо-синдром LE і різними формами хронічного агресивного гепатиту. Високі результати титру АМА в основному зустрічаються з негнійними інфекціями жовчного міхура або первинного біліарного цирозу (позитивних результатів у 90% випадках).

У цих випадках антитіла з'являються до появи клінічних симптомів і навряд чи підпадуть під вплив терапії протягом захворювання.

Низькі титри антитіл спостерігаються при склеродермії, синдромі Шегрена, ревматоїдному артриті та інших аутоімунних захворюваннях.

ASMA: Антитіла проти гладких м'язів виробляються при різних захворюваннях печінки, наприклад, гострому і хронічному гепатиті, первинному біліарному цирозі печінки, та інших формах цирозу печінки. Крім того, виявлення ASMA підтверджує діагноз СЧВ, інфекційного мононуклеозу, раку молочної залози і яєчників і злоякісних меланом.

LKM: Антитіла, які зв'язуються з р450 і асоціюються з 2 типом аутоімунного гепатиту, який переважно спостерігається в підгрупі дівчат і молодих жінок (80% поширеності). Вони можуть бути також пов'язані з гепатитом С.

APCA: Циркулюючі антитіла проти структур парієтальних клітин слизової оболонки шлунка, як правило, через злоякісну анемію. Вони можуть також бути виявлені з іншими захворюваннями шлунка (хронічний атрофічний гастрит, виразка шлунку), захворюваннями щитовидної залози (тиреїдит Хашимото, мікседема) і рідше з залізодефіцитною анемією, цукровим діабетом і у літніх пацієнтів.

Характеристика Субстрату Антигена: печінка, нирки, шлунок щура або миші/нирки, шлунок щура або миші

Перехресна реактивність: Перехресні реактивності невідомі

Виявлення антитіл засноване на принципі непрямого імунофлуоресцентного аналізу (IIFA). Слякні мікроскопічні слайди покриті частинками тканини або клітинами (HEp-2 клітини (ANA), Гранулоцитами (ANCA) або *Crithidia luciliae* (НДНК)). Якщо сироватка пацієнта містить специфічні антитіла, вони будуть зв'язуватися при першій інкубації. Після видалення незв'язаного матеріалу на стадіях промивання, зв'язані антитіла виявляються Флуоресцеїном, кон'югованим анти-людськими імуноглобулінами у другій інкубації. Специфічне флуоресцентне зафарбовування комплексу антиген-антитіло в зелений колір може бути візуалізоване за допомогою флуоресцентного мікроскопа.

3. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Будь ласка, зверніться до процедури аналізу в Загальній інструкції, розділ 11, для отримання детальних інструкцій. Наступні зауваження повинні бути взяті до уваги при роботі з наборами Тканини Гризунів:

- Час контрастного фарбування: 3-5 хвилин
- Рекомендований Скринінговий титр: 1:20

4. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

R або M LKS / R або M KS: Секція поєднаних тканин дозволяє диференціацію різних антитіл в межах однієї випробувальної зони і, отже, може застосовуватися в якості діагностичного тесту для наступних аутоімунних антитіл. (У випадку різнотипних антитіл доцільно провести подальшу діагностичну ідентифікацію). Оцінка завжди повинна бути виконана з позитивним і негативним контролем.

ANA: Наявність анти-ядерних антитіл може бути виявлена в кожному наданому зразку тканини позитивною ядерною флуоресценцією.

АМА: Наявність анти-мітохондріальних антитіл відображає дрібнозернисту цитоплазматичну флуоресценцію ниркових каналців. Дистальні каналці багаті на мітохондрії і, отже, демонструють більш інтенсивну флуоресценцію, на відміну від проксимальних каналців.

ASMA: Наявність ASMA визначається флуоресценцією гладких м'язових волокон кровососних судин нирок і шлунка, м'язової слизової, м'язової оболонки шлуночка, а також скорочувальних фібрил слизової оболонки шлунка.

APCA: Дрібно гранульована флуоресценція парієтальних клітин в слизовій оболонці шлунка вказує на APCA. Так як AMA також реагує з парієтальними клітинами, анти-мітохондріальні антитіла (ниркових каналців) повинні бути виключені при оцінці APCA.

LKM: Специфічне зафарбовування спостерігається в цитоплазмі проксимальних ниркових каналців, але не в дистальних. Печінка демонструє однорідне забарвлення гепатоцитів і не спостерігається зафарбовування в шлунку.

AMA:

- 1:20-1:80 (наприклад, 10 мкл сироватки + 790 мкл буфера для зразків). Позитивна реакція спостерігається при декількох захворюваннях печінки.
- >1:160 (наприклад, 10 мкл сироватки + 1590 мкл буфера для зразків) вказує на білярний цироз. Титри AMA залишаються постійними протягом тривалого періоду часу, і, незважаючи на лікування, так що визначення титру в якості контролю терапії не є корисним.

ASMA:

- 1:20-1:80 (наприклад, 10 мкл сироватки + 790 мкл буфера для зразків). Позитивна реакція спостерігається при декількох захворюваннях печінки, вірусному гепатиті та первинному білярному цирозі. Однак титри тут можуть впасти нижче межі визначення. Низькі титри можуть спостерігатися у пацієнтів з інфекціями жовчного міхура, алкогольного цирозу печінки, СЧВ і у 2% нормального, здорового населення.
- 1: 160 (наприклад, 10 мкл сироватки + 1590 мкл буфера для зразків) вказує на хронічний активний гепатит. На відміну від вірусного гепатиту титри падають незначно і можуть зберігатися протягом декількох років. Пацієнти з інфекційним мононуклеозом можуть також демонструвати високі титри ASMA.

APCA: Титр APCA не дає ніякої інформації про стан хвороби пацієнта. Визначення антитіл повинні бути оцінені разом з вимірюванням Внутрішнього Фактора та/або результатів гістопатології.

Відповідний кінцевий титр – це той, в якому сироватка пацієнта демонструє просту позитивну флуоресценцію. Слабка флуоресценція з титрами від 1:20 і 1:40 або невизначеності щодо клінічних результатів повинні бути перевірені шляхом контролю моніторингу. У такому випадку зразки повинні бути зібрані приблизно кожні 3 тижні і аналогічно тестовані.

5. ПРОТОКОЛ ІНТЕРПРЕТАЦІЇ ДАНИХ

LKS/KS

Дата:	Партія:
№ Слайду:	Оператор:

№ Лунки	ID	Коефіцієнт розведення	F.I.	Печінка	Нирки	Шлунок	Ядро	Антитіла	Зауваження
1.									
2.									
3.									
4.									
5.									
6.									
7.									
8.									
9.									
10.									

LKS/KS

Дата:	Партія:
№ Слайду:	Оператор:

№ Лунки	ID	Коефіцієнт розведення	F.I.	Нирки		Шлунок		Стінки судин	Антитіла	Зауваження
				Канальці	Клубочки	Парієтальні клітини	Гладкий м'яз			
1.										
2.										
3.										
4.										
5.										

6. СТАНДАРТНИЙ ВМІСТ НАБОРУ

6.1 Стандартні набори

№ Набору	Опис набору	СЛАЙДИ (10x в кожному наборі)			КОН'ЮГАТ (3.5 мл)			Позитивний контроль (1x 0.5 мл)	
		Посилання	Лунки	Покриті з	Кількість	Посилання	Опис	Посилання	Опис
517.050	гLKS з покриттям 5 лунок	s517.050	5	LKS тканина щура (L/K, загорнутий в шлунку)	1x	CDTIFA	IgG Синій ковпачок: Розчин блідо- синього кольору. Містить: BSA, анти-людське антитіло, мічене флуоресцеїном (FITC)	PCDTIFA	AMA позитивний контроль. Червоний ковпачок: безбарвний розчин. Містить: людську сироватку (розведену), азид натрію
517.101	гLKS з покриттям 10 лунок	s517.101	10	LKS тканина щура (L/K, загорнутий в шлунку)	2x				
517.051	гLKS відокремлені 5 лунок	s517.051	5	LKS тканина щура (відокремлені частинки LKS)	1x				
517.100	гLKS відокремлені 10 лунок	s517.100	10	LKS тканина щура (відокремлені частинки LKS)	2x				
518.050	мLKS відокремлені 5 лунок	s518.050	5	LKS тканина миші (відокремлені частинки LKS)	1x				
518.100	мLKS відокремлені 10 лунок	s518.100	10	LKS тканина миші (відокремлені частинки LKS)	2x				
55.050	гKS відокремлені		5	KS частинки тканини щура	1x				

У випадку, якщо значення контролів не відповідають критеріям, тест є недійсним і повинен бути повторений. Наступні технічні питання повинні бути перевірені: закінчення терміну дії (дати) підготовлених реагентів, умови зберігання, піпетки, прилади, фотометр, умови інкубації і методи промивки. Якщо протестовані елементи демонструють значення будь-які відхилення або критерії перевірки не виконуються без поважної причини, будь ласка, зв'яжіться з нашим місцевим представником.

10. ЗАБІР ЗРАЗКІВ, РОБОТА З НИМИ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Підготовка зразків: використовувати переважно недавно зібрані зразки сироватки. Забір крові проводити відповідно до національних вимог. Зберіть зразки крові асептично.

Ліпемічні, жовтяничні, гемолізовані або мікробіологічно забруднені зразки можуть спричинити інтерференцію.

Сироватки з частинками повинні бути очищені низькошвидкісним центрифугуванням (<1000 x g). Зразки крові повинні бути зібрані в екологічно чисті, сухі і порожні пробірки. Після сепарації зразки сироватки слід використовувати на протязі перших 8 годин, зберігати щільно закритими при 2-8 °C/ 35-46 °F до 48 годин, або заморожувати при -20 °C/-4 °F протягом більш тривалих періодів. Уникайте повторного заморожування і відтавання.

11. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

а. Підготовка перед піпетуванням

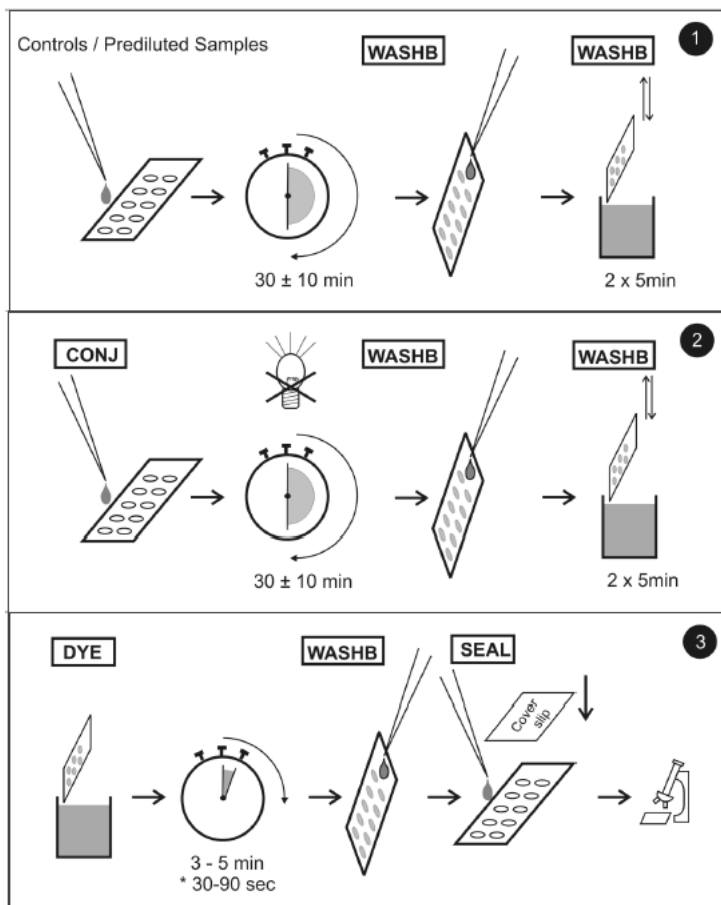
Привести всі компоненти до кімнатної температури (20-26 °C/64-78.8 °F) перед використанням, добре перемішати і дотримуватись рекомендованої схеми інкубації для оптимального виконання тесту.

1. Підготовка Промивного Буфера: Розвести концентрований буфер 1:10 дистильованою водою.
2. Розведення зразків: Розведіть сироватки пацієнтів (для скринінгового титру див. розділ **Процедура Набору** за посиланням по продукту, який ви використовуєте) з 1x Буфер для зразків. Цими продуктами є НЕР-2, нДНК, rLKS, ЕМА та інші набори.
3. Контроль готові до використання.
4. Підготовка протоколів: Листи інтерпретації даних доступні в розділі **Процедура Набору** за посиланням по продукту, який ви використовуєте.

б. Процедура проведення тесту

№	Опис кроку
1.	Витягніть необхідні слайди з мішечків і позначте їх. Не торкайтеся лунок. Не дозволяйте слайдам висохнути.
2.	Підготовка лотка для інкубації: Помістіть невеликий об'єм деіонізованої або дистильованої води в лоток для інкубації і помістіть слайди на опорах в лоток для інкубації. Інкубуйте слайди 30±10 хвилин при кімнатній температурі у вологому лотку для інкубації. Використовуйте послідовні часи інкубації для кон'югату. Перша інкубація: Внесіть адекватний об'єм кожної розведеної сироватки та контролів (готових до використання) у відповідні лунки, уникаючи прямого контакту піпетки з поверхнею слайдів. Переконайтеся, що кожна лунка повністю покривається відповідною сироваткою. Важливо використовувати стільки досліджуваного матеріалу, скільки необхідно, щоб повністю покрити лунку. Але уникайте розливу між лунками, тому що це може призвести до некоректних результатів.
3.	Промивання: Після інкубації видаліть слайди з інкубаційного лотка і промийте промивальним буфером з використанням пластикової промивної пляшки. Не розбризкуйте буфер безпосередньо на лунки. ПРИМІТКА: Для запобігання перехресного забруднення нахиліть слайд спочатку до одного рядка, і ретельно промийте промивним буфером уздовж середньої лінії на слайді, дозволяючи промивному буферу збігти з нижнього краю слайда. Потім нахиліть слайд до іншого рядка, і повторіть цю процедуру, дозволяючи промивному буферу збігти з іншого краю слайда. Промийте слайд(и) 10 хвилин з промивним буфером в блюді для фарбування слайдів. Уникати безпосереднього контакту твердих предметів з субстратом. Для отримання оптимальних результатів замінити буферний розчин один раз після 5 хвилин. Витягнути слайд(и) з блюда для фарбування слайдів і обережно видалити надлишок миючого буфера. ПРИМІТКА: Важливо, щоб лунки слайда не висихали під час процедури, так як це може призвести до пошкодження субстрату. Будь ласка, не висушуйте слайд будь-яким чином і не залишайте слайд без флуоресцентного реагенту антитіл довше, ніж кілька секунд.
4.	Друга інкубація: Після процедури промивки поверніть слайд відразу в інкубаційний лоток і покрийте кожну лунку з адекватним об'ємом FITC-кон'югату і переконайтеся, що лунка покрита повністю. Інкубуйте слайди 30±10 хвилин при кімнатній температурі в темряві.
5.	Промивання: Після інкубації видаліть слайди з інкубаційного лотка і промийте промивальним буфером з використанням пластикової промивної пляшки. Не розбризкуйте буфер безпосередньо на лунки. Промийте слайд(и) 10 хвилин з промивним буфером в блюді для фарбування слайдів. Для отримання оптимальних результатів замінити буферний розчин один раз після 5 хвилин.
6.	*Опційне контрастне забарвлення: Розведіть контрастний барвник (Еванс синій) 1:3000 в Промивальному Буфері і добре перемішати. Нахиліть контрастний барвник в блюдо для фарбування і інкубуйте слайди в ньому. Щодо часів інкубації зверніться до розділу Процедура Набору відповідно до посилання продукту. Еванс Синій охоплює неспецифічний фон флуоресценції. Видаліть слайд(и) після інкубаційного періоду і промийте миючим буфером. Видаліть надлишки промивного буфера. Будь ласка, не висушуйте слайд будь-яким чином.
7.	Середовище для заливки: Додати достатній об'єм середовища для заливки вздовж середньої лінії кожного слайда. Обережно покладіть покривне скло в положення, уникаючи бульбашок повітря.
8.	Зчитування результатів: Зчитати результати слайдів негайно при 400-800 x загальному збільшенні з флуоресцентним мікроскопом. (490 нм фільтр збудження, 510 нм бар'єрний фільтр).

с. Робочий процес



12. ПОШУК І УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

ПОМИЛКА	МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ	РІШЕННЯ	
Низька щільність клітин	– Лізис клітин після тривалого контакту з деіонізованою водою	Дотримуйтесь рекомендованої процедури промивання	
	– Буфер розбризкано безпосередньо на субстрат в лунці		
Нерівномірна флуоресценція	Протеолітичні ферменти атакували субстрат	Інактивуйте сироватку	
	Сироватка висохла в лунці, флуоресценція сильніша на краях	Завжди інкубуйте у вологому середовищі	
	Сироватка не покриває лунку	Внесіть достатній об'єм досліджуваного матеріалу	
	Перехресна реактивність між лунками	Уникайте розливання між лунками в першій інкубації	
Дифузний малюнок	Маркування слайду восковим олівцем утворює плівку на слайді	Використовуйте стандартний (не восковий) олівець	
	Мікроскоп неправильно відрегульований	Перевірте регулювання УФ-лампи	
	Слайд інкубується в холодильнику без кришки	Покрити слайди з лаком для нігтів або парафіном	
Мала чи відсутня флуоресценція	І.Ф. Мікроскоп брудний. Можливі подряпини на лінзі	Очистіть мікроскоп відповідно до інструкцій	
	Кон'югат і слайди розморожені і заморожені	Зберігати кон'югат і слайди при температурі 2 -8 °C/35-46 °F.	
	Контролі розведені	Ознайомтеся з інструкціями, використовуйте набори з готовими до використання контролями	
	– Бактеріальне забруднення сироватки або кон'югату	Перевірити умови	
Флуоресценція фону	– Мікроскоп не відрегульований	Зберігайте кон'югат в захищеному від світла	
	– Значення рН Буфера для Промивки занадто низьке (рН 7.4 ± 0.2)		
	– ФІТС-кон'югат піддається впливу світла		
	– Неправильна промивка		– Перевірте інструкції по промиванню
	– Слайди висохли		– Не допускайте висихання слайда
– Ліпемічна, гемолітична сироватка	– Використовуйте тільки свіжі сироватки		
– Помилка мікроскопа	– Перевірте правильність фільтра/об'єкта		



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com