



Интенсивность этого желтого цвета прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствующих в образце.

## Набор ИФА для количественного определения анти-митохондриальных M2 антител

**Кат. №** : EIA-3604  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DRG (Германия)

Методика от 12-2008  
Версия 3.0

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке.

### 1. НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор является непрямым иммуноферментным анализом (ELISA) для количественного определения IgG класса аутоантител против антигена митохондриального M2 субтипа в человеческой сыворотке или плазме. Анализ предназначен для диагностики *in vitro* в целях диагностики первичного билиарного цирроза печени.

### 2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анти-митохондриальные антитела (АМА) принадлежат к гетерогенной группе аутоантител, направленных против различных протеинов, что расположены во внутренней и внешней мембране митохондрии. В тканях имеет место развитие ее антигенов. Антитела субтипов, не специфических к органу, описаны кроме тех антител, которые показывают высокую специфичность к органу. Используя флюоресцентную технологию с срезами разных органов, напр. печени, желудка, почек, сердца, могут быть различены митохондриальные аутоантитела разной специфичности. Для некоторых АМА субтипов их специфический протеин остается неясным. (См. табл. в оригинале инструкции на англ. языке)

Специфические анти-митохондриальные антитела описаны для первичного желчного цирроза (РВС) как субтипы M2, M4, M8 и M9. Другие АМА субтипы относятся к другим болезням, таким как коллагенозис (АМА-M5) и LE, вызванная лекарствами и Гепатиты (АМА-M3 и АМА-M6). Гетерогенно реагируемые специфические анти-митохондриальные антитела субтипа M2 направлены против трех связанных протеинов комплекса альфа-кето кислоты дегидрогеназы, который расположен внутри митохондриальной мембраны. Описанный основной эпитоп располагается на E2 субединице и протеине X комплекса пировиноградной кислоты дегидрогеназы. К тому же, АМА-M2 аутоантитела распознают (E1 альфа и E1 бета) субединицы того же комплекса и E2 субединицы нескольких других много ферментных комплексов, таких как OGDC и VCOADC.

Для различных диагнозов РВС рекомендуется определение АМА-M2 исходя из их высокой чувствительности и специфичности.

В пациентов с другими аутоиммунными болезнями определение АМА антител дает возможность раннего скрининга антител субтипа M2 и M9, что может быть связано с развитием и/или зависимостью от РВС.

Профилирование АМА субтипов дает возможность иммунологической и прогнозной классификации РВС. Начальные симптомы РВС часто показывают только антитела АМА-M2 субтипов (иногда в комбинации с АМА-M9), так как прогрессирование причин и смешивание с синдромом острого хронического гепатита (САН) связано с антителами субтипов АМА-M2, АМА-M4 и АМА-M8.

### 3. ПРИНЦИП ИССЛЕДОВАНИЯ

Высоко очищенный антиген митохондриального M2 привит к микроячейкам. Антитела к этому антигену, если присутствуют в разбавленной сыворотке, связываются с микроячейками. Промывание микролунок удаляет несвязанные антитела сыворотки. Анти-человеческие IgG конъюгированные пероксидазой хрена иммунологически связываются с связанными антителами пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микролунок удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт.

### 4. ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
- Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие антител к гепатиту В и ВИЧ. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
- Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте тем не менее не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности.
- Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
- Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
- Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

### 5. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

1. Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 стрипов по 8 лунок каждый, покрытых смесью высоко очищенным антигеном митохондриального M2 субтипа. Готовый к использованию. – **1 планшет**.
2. Калибраторы АМА-M2 в сыворотко-буферном матриксе, содержащим IgG: 0;12,5; 25; 50; 100 и 200 МЕ/мл. Готовые к использованию. – **6 флаконов, 1,5 мл каждый**
3. АМА-M2 контроли в сыворотке/буферном матриксе \*положительный и отрицательный), соответствующие концентрации см. на вкладыше – **2 флаконов, 1,5 мл каждый**.
4. Буфер образцов АМА-M2, желтый, **концентрат - 1 флакон, 20 мл**.
5. Раствор ферментного конъюгата (бледно красный), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые пероксидазой хрена - **1 флакон, 15 мл**.
6. Раствор субстрата ТМБ - **1 флакон, 15 мл**.
7. Стоп-раствор (1M HCl) – **1 флакон, 15 мл**.
8. Промывочный раствор, **концентрат - 1 флакон, 20 мл**.

### 6. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните набор при 2-8°C.
2. Содержит ячейки микропланшета запечатанные в сухом пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны до окончания срока пригодности.
4. Не поддавайте реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
5. Разбавленные буфер образцов и моющий буфер стабильны 30 дней при хранении при 2-8°C

### 7. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Микропланшетный ридер с длиной волны измерения 450 нм;
2. Многоканальный диспенсер или пипетка для дозирования на 100 мкл;
3. Вортекс;
4. Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл;
5. Лабораторное часовое устройство;
6. Программное обеспечение
7. Дистиллированная вода или деионизированная;
8. Мерные цилиндры на 100 и 1000 мл
9. Пластиковый контейнер для хранения промывочного р-ра;

**8. СБОР, ПОДГОТОВКА И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦАМИ**

1. Соберите образцы цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
2. Дайте возможность крови стечь и отделите сыворотку центрифугированием.
3. Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать гемолитической или липемической сыворотки.
4. Образцы должны храниться при 2-8°C до 5 дней или при -20°C до шести месяцев.
5. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов. Это может привести к потере активности аутоантителами.
6. Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

**9. ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ**

1. Не используйте компоненты набора после окончания срока пригодности.
2. Не меняйте компоненты набора между разными лотами.
3. Все материалы следует привести к комнатной температуре.
4. Все реагенты при начале анализа должны быть готовы к работе. После начала анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
5. Проводите все шаги анализа в указанном порядке.
6. Всегда используйте свежую разбавленную сыворотку.
7. Пипетируйте все реагенты и образцы на дно лунок.
8. Для предотвращения загрязнения меняйте наконечники между образцами и разными контролями набора.
9. Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
10. Все шаги инкубации должны проводиться определенное время.
11. Контрольная сыворотка должна анализироваться как неизвестная для проверки реагентов и анализа.
12. Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

**10. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ****Приготовление буфера образцов**

Разбавьте содержимое флакона с 5-кратным концентратом буфера образцов дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней или до конца срока годности.

**Приготовление промывочного раствора**

Разбавьте содержимое флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

**Приготовление образца**

Разбавьте образцы пациентов 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте до 10 мкл образца 990 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

**11. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Приготовьте достаточное количество стрипов для постановки калибраторов, контролей и разбавленных проб пациентов в дублях. (См. рис. на стр. 12 в оригинале инструкции на англ. языке).
2. Добавьте **100 мкл** калибраторов, контролей и разбавленных образцов пациентов в каждую лунку.
3. Инкубируйте **30 минут** при комн. температуре (18 - 28 °C).
4. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
5. Добавьте **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую лунку.
6. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.
7. Удалите содержимое лунок и трижды промойте **300 мкл** промывочного раствора.
8. Добавьте **100 мкл** субстрата ТМБ в каждую лунку.
9. Инкубируйте **15 минут** при комнатной температуре.

10. Добавьте **100 мкл** стоп-раствора в каждую лунку и выдержите 5 минут.
11. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Бихроматическое измерение проводите при 600-690 нм. **Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считайте оптическую плотность за это время.**

**Автоматизация**

Данный набор пригоден для использования с автоматическим ELISA процессором. Тестовая процедура, описанная выше, пригодна для использования с или без автоматики.

**12. ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ****12.1 Контроль качества**

Данный тест пригоден, если ОП при 450 нм для положительного (1) и отрицательного контроля (2) и калибраторов A-F соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, что поставляется вместе с набором. Если критерии не соответствуют, результаты не пригодны, и тест необходимо повторить.

**12.2 Вычисление результатов**

Для данного набора рекомендуется 4-параметрическая регрессия с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

**Линейно-логарифмическая миллиметровка рекомендуется**

Сначала рассчитайте средние оптические плотности для каждого калибратора. Используйте линейно-логарифмическую миллиметровку и отложите среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Проведите оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

**Пример вычисления**

Пример вычисления результатов смот. в оригинале инструкции на англ. языке на стр. 14. В этой табл. показаны типичные данные, которые даны только для иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления результатов пациентов.

**12.3 Интерпретация результатов**

При изучении нормального диапазона использовалась кровь здоровых пациентов, и был установлен следующий диапазон значений :

	AMA-M2 (МЕ/мл)
норма:	< 10
повышенный:	≥ 10

Положительные результаты должны быть выверены в соответствии с полной клинической картиной пациента. Также каждое терапевтическое решение должно быть принято индивидуально. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила свой собственный диапазон нормальных и патологических значений. Данные, приведенные выше, следует принимать как рекомендованные.

**13. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****13.1 Параллелизм**

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки с высокими концентрациями антитела были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Анализ показывает линейность на всем диапазоне измерения.

**13.2 Точность (воспроизводимость)**

Статистика была посчитана для трех образцов по результатам 24 определений в одном круге анализов для точности внутри серии. Для определения точности между сериями были рассчитаны результаты 5 различных серий анализов с 6 определениями каждого:

Внутри серии		
Образец No	Среднее [МЕ/мл]	КВ [%]
1	39,8	7,0
2	81,3	3,8
3	177,3	3,6

Между сериями		
Образец No	Среднее [МЕ/мл]	КВ [%]
1	401,0	6,2
2	84,6	11,8
3	180,4	3,8

### 13.3 Чувствительность

Минимально детектируемый предел для AMA-M2 –1,0 МЕ/мл.

### 13.4 Специфичность

Микропланшет покрыт смесью высоко очищенным антигеном митохондриального M2 субтипа. Поэтому данный тест использует только аутоантитела специфические к протеинам а-кето кислоты дегидрогеназы комплекс. Не обнаружена перекрестная реактивность с другими митохондриальными аутоантигенами.

### 13.5 Клибровка

Тест система калибрована международным референтным препаратом ВОЗ 67/183 при 100 МЕ/мл.

### 14. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

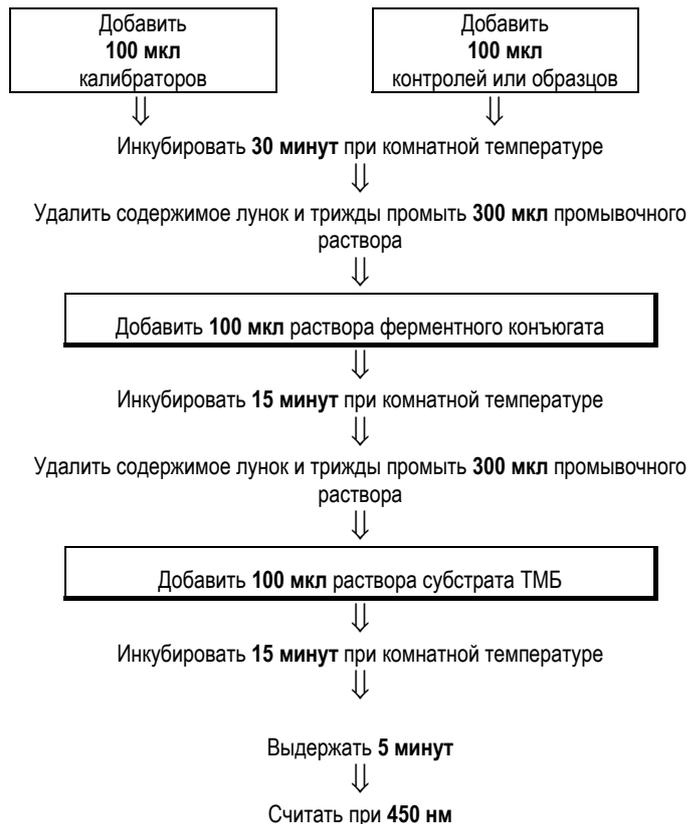
Данный набор используется в диагностических целях, но сам он не является диагностическим. Определение клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

Не все первичные циррозы печени являются положительным к AMA-M2

### 15. ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не влияет гемолизированная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияние при использовании антикоагулянтов. Но рекомендуется не использовать сильно гемолизированную или липемическую сыворотку.

## СХЕМА ИНКУБАЦИИ



Более детальное описание методики см. выше.

Таблица 1.

Калибраторы									
№	Лунки	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	Заяв. Конц.	КВ %
ST1	A1/A2	0,13	0,011	0,012	0,1	0,1	0,0	0,0	12
ST2	B1/B2	0,437	0,422	0,430	12,9	12,4	12,6	12,5	2
ST3	C1/C2	0,741	0,720	0,731	25	24	25	25	2
ST4	D1/D2	1,174	1,148	1,161	50	48	49	50	2
ST5	E1/E2	1,700	1,701	1,701	102	103	102	100	0
ST6	F1/F2	2,173	2,143	2,158	202	193	197	200	1

### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: info@diameb.ua  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)