

«УТВЕРЖДАЮ»



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Реагенты для лабораторной диагностики
аутоиммунных заболеваний *in-vitro* методом иммуноблота, в
наборах и отдельных упаковках,
Производства: «Оргентек Диагностика ГмбХ», Германия**

**«Orgentec Diagnostika GmbH»,
Carl-Zeiss-Strasse 49
55129 Mainz, Germany
Tel +49 6131 92580,
Fax +49 6131 925858**



Gastro-5-Line

набор для полуколичественного определения аутоантител к внутреннему фактору, париетальным клеткам, тканевой трансглутаминазе, *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) и глиадину методом иммуноблота на мембране.

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Gastro-5-Line - набор, основанный на иммуноферментном анализе, для полуколичественного определения аутоантител классов IgG и IgA к внутреннему фактору, париетальным клеткам, тканевой трансглутаминазе, *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) и глиадину. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях диагностики желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Каждый отдел ЖКТ склонен к своим собственным уникальным заболеваниям. Болезнь Крона, целиакия, язвенные колиты и злокачественная анемия являются четырьмя наиболее серьезными диагнозами, которые отражают длительные тенденции заболеваний пищеварительного тракта.

Заболевания пищеварительного тракта имеют иммунную природу, с увеличением проницаемости пищеварительного тракта, и ассоциированы с большим перечнем иммунных заболеваний человека в целом. Симптомы при таких условиях могут проявляться у пациентов за много лет до постановки диагноза.

Внутренний фактор

Аутоантитела к сывороточному внутреннему фактору могут определяться в 50 - 70% случаев у пациентов при злокачественной анемии и они высокоспецифичны для анемии Biermer, при этом пока не документировано ни одного случая истинно положительного результата в контрольной группе здоровых [1]. Существуют два типа аутоантител к внутреннему фактору [2]. Тип I аутоантител блокирует на молекуле внутреннего фактора сайт связывания с кобаламином, мешая захвату витамина. Тип II аутоантител блокирует другой сайт на молекуле внутреннего фактора, который вовлечен в связывание комплекса внутренний фактор/кобаламин с рецепторами подвздошной кишки. Оба типа аутоантител приводят к одинаковому патологическому эффекту, мешая всасыванию кобаламина рецепторами подвздошной кишки.

Париетальные клетки

Циркулирующие антитела к париетальным клеткам желудка могут выявляться в 80-90% случаев у пациентов при злокачественной анемии, кроме того, они выявляются у 2-5% здоровых взрослых людей [3]. Биохимические и молекулярные исследования

идентифицировали ответственный антиген как α - и β -субъединицу желудочной H⁺/K⁺ АТФазы. H⁺/K⁺ АТФаза желудка (ЕС 3.6.1.3) это фермент, транспортирующий водород, ответственный за подкисление просвета желудка [4].

Тканевая трансглутаминаза (tTG)

Анти-tTG антитела класса IgA являются высокочувствительным маркером целиакии, 95-100%, и обладает специфичностью от 90 до 97 %. Было показано, что фермент тканевая трансглутаминаза (tTG) является основной, если не единственной, мишенью для эндомизимальных антител. Уровень этих антител снижается в начале безглютеновой диеты, таким образом облегчая наблюдение за эффективностью диеты [5, 6, 7].

ASCA (антитела к *Saccharomyces cerevisiae*)

ASCA направлены против эпитопов олигосахарида, состоящего из маннозы, на клеточной стенке (фосфопептидоманнан) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [8]. В целях дифференциальной диагностики между болезнью Крона и язвенным колитом могут быть использованы определения ANCA (анти нейтрофильные цитоплазматические антитела) и ASCA (антитела к *Saccharomyces cerevisiae*). IgG, так же как и IgA, обладают специфичностью 95-100% по отношению к болезни Крона. ASCA строго ассоциированы с болезнью Крона. Исследования показали 5% положительных случаев для IgG и 7% - для IgA ASCA при язвенном колите, тогда как при болезни Крона чувствительность для IgG составляет 75% и 60% для класса IgA ASCA [9, 10].

ГЛИАДИН

У пациентов с целиакией на фоне приема глютена экспрессируется высокий уровень антител к глиадину и tTG в сыворотке.

В случае удаления глютена из их диеты титр антител снижается, а, возможно, исчезает совсем. Глиадины -- это белки, содержащие большое количество таких аминокислот, как пролин и глутамин. Этот белок встречается в злаках, семенах пшеницы, овса, ячменя и ржи. Взаимосвязь целиакии и избирательного дефицита IgA класса потенциально может привести к ложноотрицательным результатам. Таким образом, если целиакия является вероятным диагнозом, рекомендуется проводить определения IgG класса аутоантител [11, 12].

Набор Gastro-5-Line сочетает в себе преимущества техники иммуноблота и панель хорошо подобранных антигенов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые препараты антигенов иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются с мембраной. При промывке с мембранных стрипов удаляются не связавшиеся антитела. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к IgG и IgA человека иммунологически связывается с антителами, присутствовавшими в сыворотке пациентов и связавшимися на мембране с антигеном. При этом образуется комплекс конъюгат/антитело/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется не связавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата гидролизует с образованием нерастворимого сине-

фиолетового продукта. При промывке с мембранных стрипов удаляется не гидролизованный субстрат. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG и IgA классов антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. 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 мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / p-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он 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. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При вылипании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смыть большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
8. Не отбирайте образцы ртом
9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или нулевых сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами нативных или рекомбинантных антигенов. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, концентрат 50x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, NaN_3 <0.1 % (w/w)) ферментного конюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG-антитела, и поликлональные кроличьи анти-человеческие IgA-антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (BCIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл

Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуколичественного анализа. Готовы к использованию	1 или 2
Ванночки с инкубационными камерами	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Качающаяся платформа
- Пипет

Лабораторный таймер

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 1000 мл

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантительной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование дезактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. 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.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пипетта.
8. Для избежания переходящей контаминации мойте накопечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей

9. Необходимо соблюдать время всех инкубаций

10. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C не менее 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Используя пинцет, поместите Gastro-5-Line стрипы и добавьте по 1.0 мл буфера для образцов в каждую инкубационную камеру. Аккуратно покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.

2. Внесите по 10 мкл сыворотки пациентов непосредственно в камеру (конечное разведение 1:101).

3. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.

4. Осторожно удалите разведенную сыворотку со стрипов, полностью.

5. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.

6. Внесите по 1.0 мл ферментного конъюгата в каждую камеру.

7. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.

8. Осторожно удалите ферментный конъюгат со стрипов, полностью.

9. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.

10. Внесите по 1.0 мл субстрата на каждый стрип.

11. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.

12. Удалите субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой, по 1.0 мл три раза по 5 минут каждый для остановки реакции.

13. Осторожно высушите стрипы (промокните) фильтровальной бумагой.

14. Перед оценкой дайте стрипу высохнуть на воздухе.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если Контрольная сыворотка (первая линия), контроль конъюгата (вторая линия) и контроль дискриминационного уровня - cut-off (третья линия) изменили цвет в пределах реактивной полосы. Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

Интерпретация результатов

Антигены расположены на мембране в порядке, указанном на рисунке:

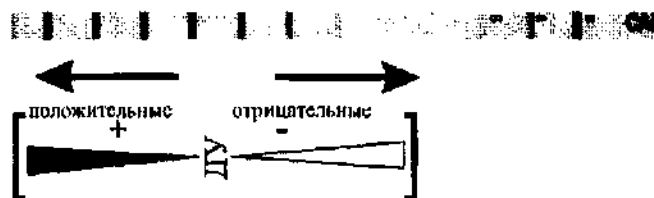
Глиадин
ASCA
TG
Паритетальные клетки
Внутренний фактор
Контроль ДУ
Контроль конъюгата
Контрольная сыворотка

Проявившиеся линии должны сравниваться с калибровочным стрипом следующим образом:



1. Сравните линию контроля ДУ стрипа, на котором проводился анализ сыворотки пациента, с калибровочными линиями на калибровочном стрипе для корректировки.

2. Сравните линии стрипа, на котором проводился анализ сыворотки пациента, с калибровочными линиями для полуколичественного анализа, задавая контроль ДУ.



Замечания по оценке результатов анализа образцов:

1. Данный полуколичественный метод определения специфических аутоантител в сыворотке пациентов позволяет провести дискриминацию между отрицательным, пограничным, слабо положительным, положительным и строго положительным ответами. Образцы, для которых был получен пограничный результат, должны быть проанализированы еще раз или протестированы с помощью другого метода.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Специфичность:

С помощью набора Gastro-5-Line были протестированы сыворотки пациентов с известной специфичностью и здоровых доноров. Для всех образцов донорских сывороток были получены отрицательные результаты по всем антигенным специфичностям.

Калибровка:

Чувствительность, специфичность и дозозависимость метода иммуноблота Gastro-5-Line оценивалась с помощью сывороток, клинически заданных с помощью внутреннего контроля качества, содержащих различные относительные количества сывороток известных специфичностей.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Метод Gastro-5-Line может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

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.

ЛИТЕРАТУРА

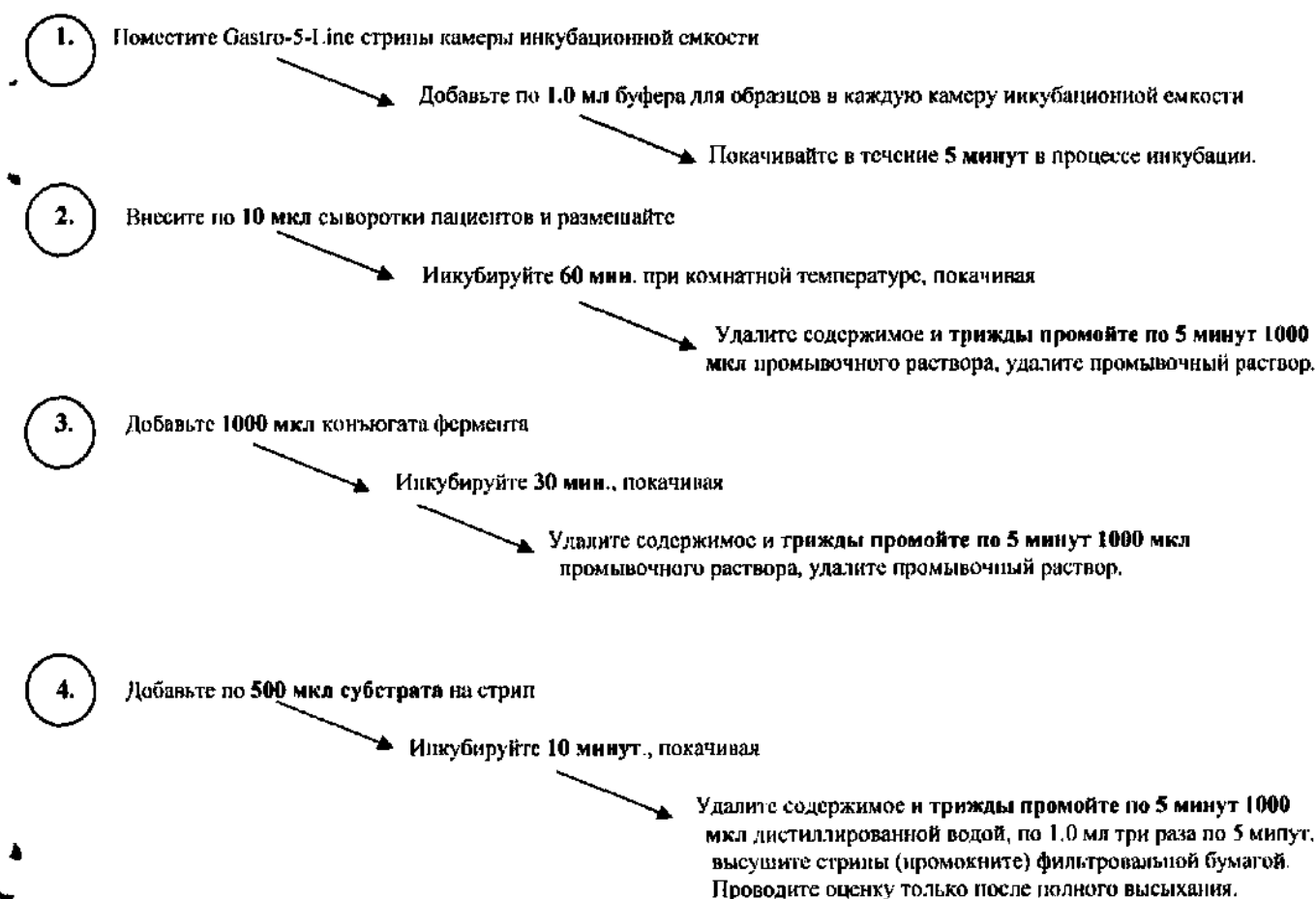
1. Roubey Carmel, R. Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. Clin. Exp. Immunol. 1992, 89:74-77.
2. Schade, S.G., P.L. Feick, M.H. Imrie, and R.E. Schilling. In vitro studies on antibodies to intrinsic factor. Clin. Exp. Immunol. 1967, 2:399-413.
3. Uibo, R., Krohn, K., Villako, K., Tammur, T., Tamm, A. The relationship of parietal cell, gastrin cell and thyroid autoantibodies to the state of the gastric mucosa in a population sample. Scand. J. Gastroenterol. 1984, No. 19, pp. 1075-1080.
4. Rabon, E. C. and Reuben M. A.. The mechanism and structure of the gastric H/K-ATPase. Annu. Rev. Physiol. 1990, No. 52, pp. 321-344.

5. Fesus, L., And M. Piacentini. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Trends Biochem. Sci., 2002, 27:534-539.
 6. Dieterich, W. Et al. Autoantibodies to tissue Transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol., 1998, 115:1317-1321.
 7. Dieterich, W. Et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Med., 1997, 3:797-801.
 8. Sendid, B., J.F. Colombel, P.M. Jacquinet, C. Faille, J. Fruit, A. Cortot, D. Lucidarme, D. Camus, and D. Poulain. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's Disease. Clin. Diag. Lab. Immunol., 1996, 3(2):219-226.
 9. Main, J., H. McKenzie, G.R. Yeaman, M.A. Kjerr, D. Robson, and C.R. Pennington. Antibody to Saccharomyces cerevisiae (baker's yeast) in Crohn's disease. Brit. J. Med., 1988, 297:1105-1106.
 10. McKenzie, H., J. Main, C.R. Pennington, and D. Parat. Antibody to selected strains of

Saccharomyces cerevisiae (baker's and brewer's yeast) and Candida albicans in Crohn's disease. Gut, 1990, 31:536-538.
 11. Sollid, L.M. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Rev., 2002, 2:647-655.
 12. Dieterich, W. Et al. Serum antibodies in Celiac Disease. Clin. Lab., 2000, 46:361-364.

Информация для заказа
119899, Москва, Ленинские горы,
ЗАО "БиоХимМак"
тел. (095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,
факс (095) 939-09-97
E-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ





Liver-7-Line

**Набор для полуколичественного определения
AMA-M2, анти-SLA/LP, анти-LKM, анти-LC1,
анти-F-актин, анти-десмин и анти-миозин
аутоантител методом иммуноблота на мембране.**

Кат. № 416-7200/8 (ORG 720-08) В стрипов

Апрель 2008

Замечание от ЗАО «БиоХимМая»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Liver-7-Line - набор, основанный на методе иммуноблота на мембране, для полуколичественного определения митохондриальных антител M2 подтипа (AMA-M2), антител к растворимым антигенам печени (SLA/LP), антител к микросомам (антиген тип I) печени и почек (LKM-1) и цитозольному антигену (антиген тип I) печени (LC1). Кроме того, данный метод выявляет аутоантитела к F-актину, десмину и миозину, трем различным антигенам гладкой мускулатуры (SMAs). Liver-7-Line Метод предназначен только для диагностики *in vitro*, могут быть исследованы образцы сыворотки или плазмы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

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.

Заболевание 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-7-Line ORGENTEC представляет собой иммуноблот, и предназначен для серологического исследования с целью выявления аутоиммунного гепатита (АИГ). Одновременное определение аутоантител к семи различным антигенам делает возможной дифференциальную диагностику АИГ и исключение других заболеваний печени.

AMA-M2

Антимитохондриальные антитела (AMA) это гетерогенная группа аутоантител, направленных к различным белкам внутренней и внешней сторон митохондриальной мембраны. AMA подтипа M2 направлены к эпитолам комплекса пируватдегидрогеназы. Высокая чувствительность и специфичность аутоантител M2 делает их прекрасным инструментом для выявления первичного билиарного цирроза (РБС).

AMA определяются в 90 - 95% случаев у больных РБС; выявление значительно повышенного титра AMA (>1:40 методом непрямой иммунофлуоресценции) это достоверный признак РБС. AMA также определяются у примерно 25 % больных АИГ, хотя в этих случаях титры обычно низкие.

Антитела к SLA/LP

Антитела к растворимому антигену печени (SLA/LP) это высоко специфичный маркер АИГ-1. Аутоантиген-мишень - цитозольный белок с молекулярной массой 50 кДа, возможно, относится к рибонуклеопротеидному комплексу.

Антитела к LKM-1

Серологическим маркером АИГ-2 являются антитела к микросомам (I типа) печени и почек. Аутоантиген-мишень - цитохром P450 2D6 (CYP2D6). Антитела к LKM-1 также выявляются у до 7% пациентов с хроническим гепатитом С3, включая дополнительный эпипот CYP2D64.

Антитела к LC-1

Антитела к цитозольному антигену (I типа) печени (LC-1) являются специфическим маркером и выявляются у до 50 % больных АИГ-2. Анти-LC-1 обнаруживаются у примерно половины всех пациентов, у которых присутствуют анти-LKM-1 антитела.

В отличие от анти-LKM-1, титр антител к LC-1 коррелирует с активностью заболевания.

Показано, что анти-LC-1 единственный серологический маркер, выявляемый у 10 % больных АИГ. Аутоантиген-мишень антител к LC-1 - фермент форминилотрансфераза циклодеаминаза (FTCD).

Анти-SMAs

Анти-SMAs это антитела к гладкой мускулатуре. Они являются типичными маркерами АИИ-I. SMA антитела выявляются у 87 % больных АИИ, либо как единственный маркер заболевания, либо в сочетании с ANA1 (антиядерными антителами). Анти-SMAs могут быть направлены к микрофиламентам (F-актин или миозин) или к промежуточным филаментам (десмин) гладкой мускулатуры. В случаях I типа АИИ, преимущественно выявляются антитела к F-актину.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые антитела AMA-M2, SLA/LP, LKM,LC1 и SMA иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной 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, образцы комплекса конъюгат/антитело/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизуется с образованием нерастворимого синего-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

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами данного набора, содержащими компоненты человеческого происхождения, следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / p-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он 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. В концентрациях, присутствующих в реагентах (0.09%), он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, настоятельно рекомендуется следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При вылинии реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
8. Не пипетируйте ртом

ORGENTEC Diagnostika GmbH, Liver-7-Line.

© Перевод на русский язык ЗАО «БиоХимМак», Москва 9392421, 9395808, факс (495) 939-09-97.

9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами антигенов AMA-M2, SLA/LP, LKM, LC1, F-актина, десмина и миозина. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию. Данный буфер специально разработан для набора Liver-5-Line и не может быть заменен буфером для образцов из других наборов для иммуноблотов.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, концентрат 50x	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (BCIP/NBT) Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл
Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуквантитативного анализа. Готовы к использованию.	1 или 2
Емкости для инкубации	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при $2 - 8^\circ\text{C}$ в их оригинальной упаковке
2. Храните нитроцеллюлозные стрипы в хорошо запечатанном пластиковом контейнере, с осушителем
3. Важно: Калибровочный стрип очень чувствителен к свету. Пожалуйста, храните его в темноте.
4. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
5. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться во время работы или хранения.
6. Разведенный буфер для промывок стабилен при $2-8^\circ\text{C}$ по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пинцет

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерный цилиндр на 1000 мл

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Набором Liver-7-Line протестировали образцы сывороток пациентов с известной специфичностью и доноров крови, используя обычную процедуру метода. Для всех доноров крови были получены отрицательные результаты для всех специфических антигенов.

КАЛИБРОВКА

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота Liver-7-Line оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Liver-7-Line может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

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.

ЛИТЕРАТУРА

См. английскую инструкцию.

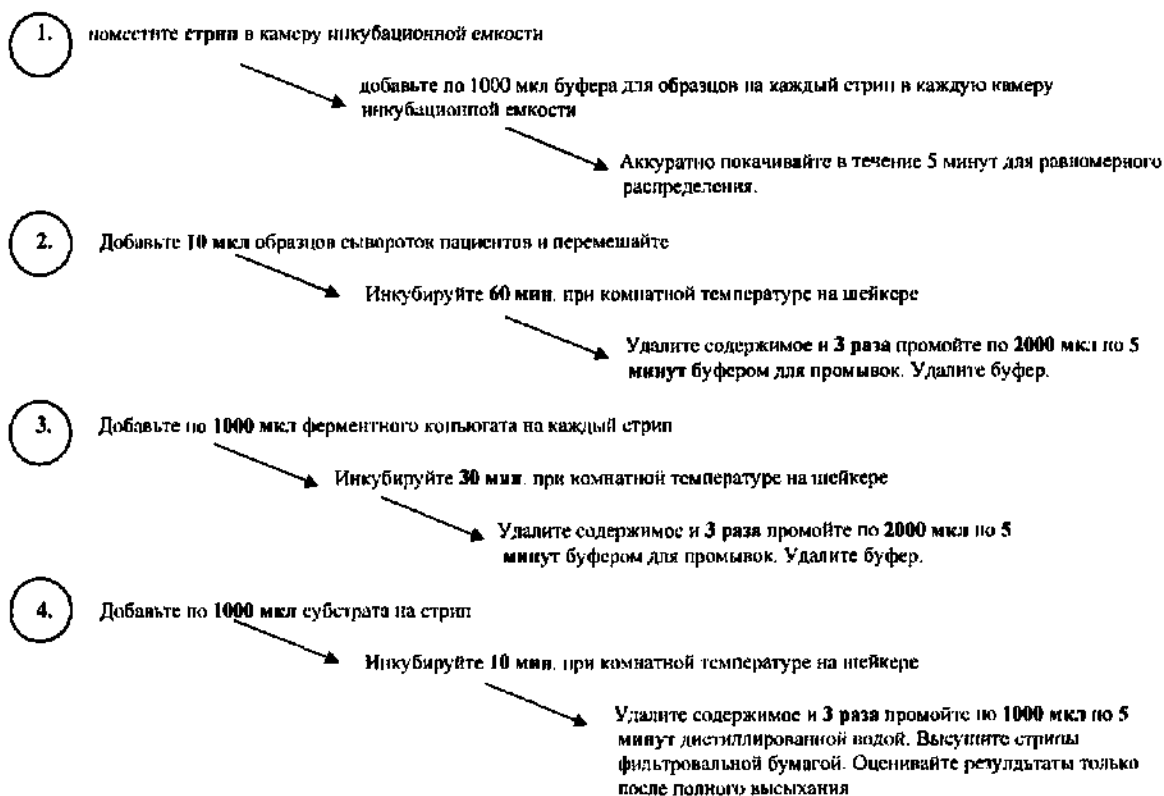
**119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак**

**Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,**

факс (095) 939-09-97.

e-mail: info@biochemmuck.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ





ANCA-3-Line

**Набор для полуколичественного определения
аутоантител к протеиназе 3 (PR3),
миелопероксидазе (MPO) и клубочковой
базальной мембране (GBM)
иммуноферментным методом на мембране.**

Замечание от ЗАО «БиоХимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиоХимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

ANCA-3-Line - набор, основанный на иммуноферментном анализе на мембране, для полуколичественного определения аутоантител к PR3, MPO и GBM. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* с целью диагностики васкулитов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Антинейтрофильные цитоплазматические антитела (ANCA) представляют собой группу антител, специфичных к компонентам цитоплазмы нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов. Данный набор ANCA-3-Line разработан для скрининга на аутоантитела к PR3, MPO и GBM. Определение этих антител значимо для выявления системного васкулита и дифференциальной диагностики системных заболеваний.

PR3 (Протеиназа 3)

PR3-ANCA является классическим аутоантигеном при гранулематозе Вегенера, с клинической специфичностью более 95%. Гранулематоз Вегенера – это первичный гранулематоз с проявлениями васкулита. Обычно титр антител коррелирует с активностью заболевания. В большинстве случаев при активной фазе заболевания могут быть обнаружены очень высокие титры анти-PR3 антител. В период проведения терапии титр антител падает и результаты становятся отрицательными к началу ремиссии.

MPO (Миелопероксидаза)

Антиген-мишень миелопероксидаза (MPO) в основном присутствует (70%) при микроскопическом полиангиите (MPA). Так как дифференциальная диагностика между MPA и другими аутоиммунными заболеваниями с пультморенальным синдромом (например, синдром Гудпасчера, системная красная волчанка, гранулематоз Вегенера) часто затруднена, выявление антител к MPO

является, особенно на ранней стадии диагностики, очень важным.

GBM (клубочковая базальная мембрана)

Реактивность специфичных анти-GBM антител при синдроме Гудпасчера направлена к 29 кДа домену NC1 α -3 цепи коллагена IV типа GBM. Первично синдром Гудпасчера является аутоиммунным заболеванием почек. Синдром рассматривается как аутоиммунное расстройство, состоящее из трех частей – гломерулонефрита, легочной геморрагии и образование анти-GBM антител.

В наборе ANCA-3-Line удачно сочетаются все преимущества метода иммуноблота и панели хорошо подобранных антигенов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые препараты антигенов иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной 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, гидролизуетс с образованием нестероидного сине-фиолетового продукта. При промывке с мембранных стрипов удаляется не гидролизованный субстрат. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации IgG антител, присутствовавших в исходном образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных летов.
3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами данного набора, содержащими компоненты человеческого происхождения, следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-нитрофосфат / p-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Некоторые компоненты набора (например, контроль, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он 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. В концентрациях, присутствующих в реагентах (0.09%), он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, настоятельно рекомендуется следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При вылинии реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

*8. Не пипетируйте ртом

9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами пассивных антигенов. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию. Данный буфер специально разработан для набора ANCA-3-Line и не может быть заменен буфером для образцов из других наборов для иммуноблоттов.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, <i>концентрат 50x</i>	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, NaN ₃ <0.1 % (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи античеловеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (BCIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл
Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуквантитативного анализа. Готовы к использованию.	1 или 2
Емкости для инкубации	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните нитроцеллюлозные стрипы в хорошо запечатанном пластиковом контейнере, с осушителем.
3. Важно: Калибровочный стрип очень чувствителен к свету. Пожалуйста, храните его в темноте.
4. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
5. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться во время работы или хранения.
5. Разведенный буфер для промывок стабилен при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пинцет

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерный цилиндр на 1000 мл

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования ступков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C до 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутофлуоресцентной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. 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.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Для избежания перекрестной контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
8. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
9. Необходимо точно соблюдать время всех инкубаций
10. Контрольные сыворотки или пулы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для промывок

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Используя пипет, поместите ANCA-3-Line стрип и добавьте по 1.0 мл буфера для образцов в каждую камеру инкубационной емкости. Аккуратно покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.
2. Внесите по 10 мкл образцов сывороток пациентов непосредственно в камеру (конечное разведение 1:101).
3. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
4. Осторожно полностью удалите разведенную сыворотку со стрипов.
5. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.

6. Внесите по 1.0 мл ферментного конъюгата в каждую камеру.
7. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
8. Осторожно полностью удалите ферментный конъюгат со стрипов.
9. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
10. Внесите по 1.0 мл субстрата на каждый стрип.
11. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
12. Удалите субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой, по 1.0 мл три раза по 5 минут каждый, для остановки реакции.
13. Осторожно высушите стрипы (промокните) фильтровальной бумагой.
14. Перед оценкой дайте стрипам высохнуть на воздухе.

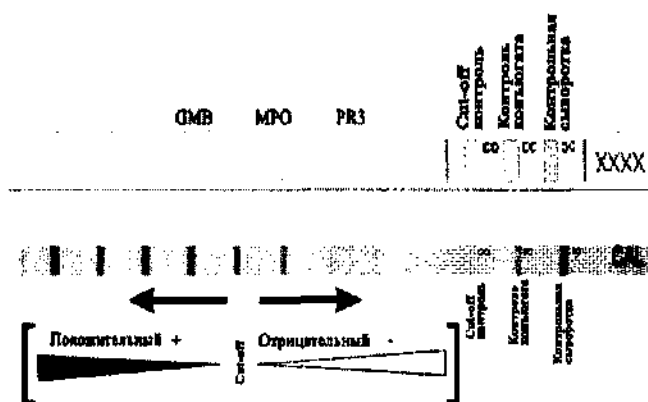
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если Контрольная сыворотка (первая линия), контроль конъюгата (вторая линия) и контроль дискриминационного уровня «Cut-Off» (третья линия) демонстрируют преобразование субстрата в виде образовавшихся бондов! Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

Интерпретация результатов

Антигены расположены на мембране в порядке, указанном на рисунке:



Замечания по интерпретации результатов

Данный полуколичественный метод определения специфических аутоантител в образцах сывороток пациентов позволяет различать отрицательный, пограничный, слабо положительный, положительный и строго положительный результаты. Образцы с пограничными результатами должны быть протестированы еще раз этим или альтернативным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Набор ANCA-3-Line охарактеризовывали тестированием образцов сывороток пациентов с известной специфичностью и доноров крови, используя обычную процедуру метода. Для всех доноров крови были получены отрицательные результаты для всех специфических антигенов.

КАЛИБРОВКА

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота ANCA-3-Line оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

ANCA-3-Line может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

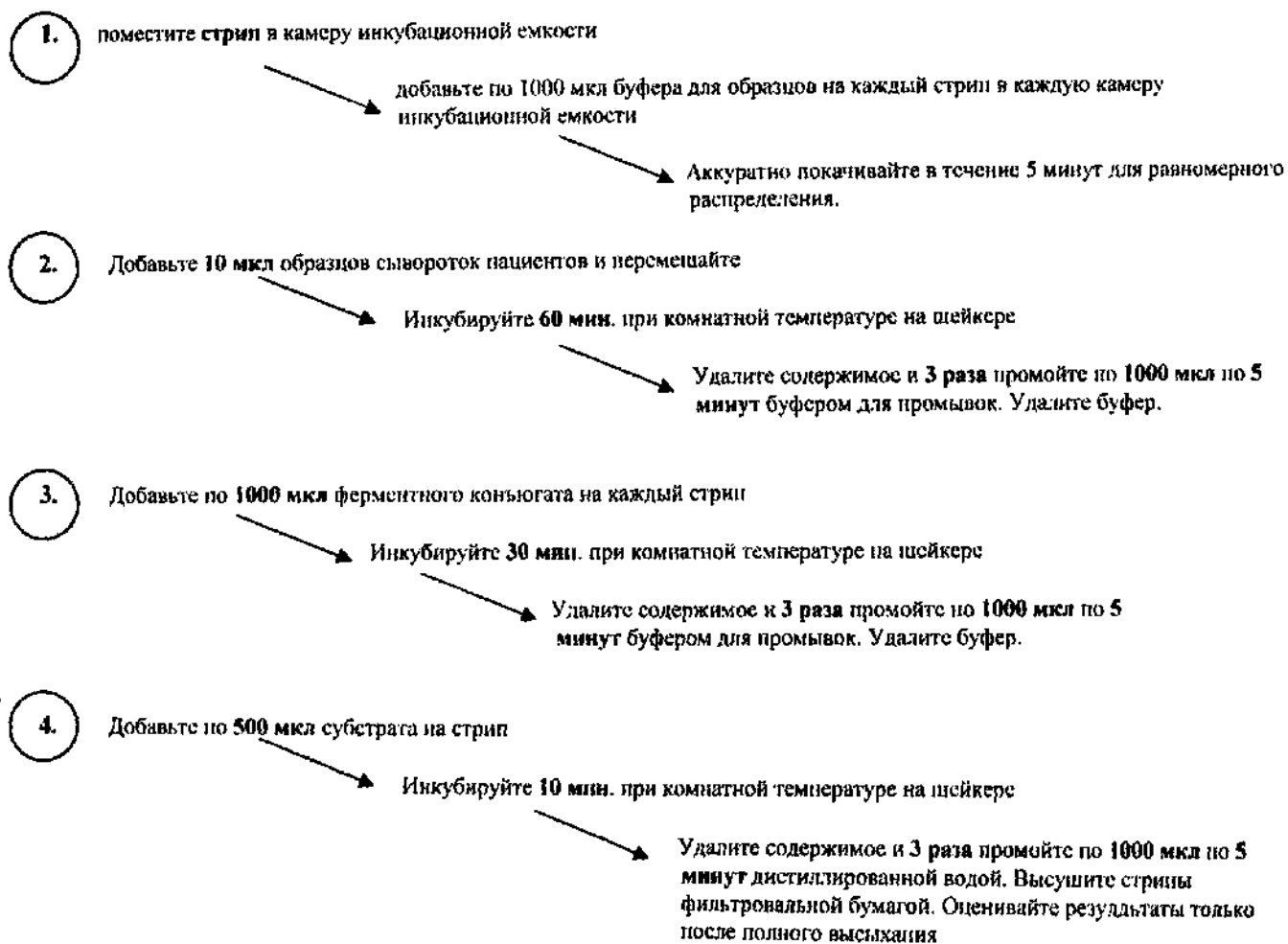
Не наблюдалось интерференции при тестировании образцов с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемией (до 3 г/дл триглицеридов) или повышенным содержанием билирубина (до 40 мг/дл). Не наблюдалось какого-либо влияния при использовании антикоагулянтов. Однако, не рекомендуется использовать образцы с сильным гемолизом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

ЛИТЕРАТУРА

См. английскую инструкцию.

119992, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 247-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (095) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru

СХЕМА ИНКУБАЦИИ



ANA - 9-Line

Набор для полуколичественного определения антиядерных антител методом иммуноблота на мембране

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для полуколичественного определения аутоантител класса G к экстрагируемым ядерным антигенам (ENAs): SS-A 52, SS-A 60, SS-B, RNP, Sm, центромера B, Jo-1, Scl-70 и рибосомальные белки. Анализ предназначен для диагностики *in vitro* аутоиммунных заболеваний.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Системные аутоиммунные заболевания мультифакторны в клинических проявлениях и имеют большое количество сходных симптомов. Для диагностики аутоиммунных ревматических заболеваний с целью четкой интерпретации результатов необходимо ограничить группу больных только пациентами с очевидными признаками аутоиммунного заболевания. Присутствие аутоантител против обычно недоступных антигенов (митохондрии, нуклеоплазмы, ядерного матрикса и нуклеосом) - фактически один из признаков системного аутоиммунного заболевания (Tan, 1988; Sturges, 1992).

В последнее время выяснилось, что системные заболевания можно дифференцировать по их профилю антиядерных антител (ANA). Существует тесная корреляция между профилем присутствующих ANA и конкретным заболеванием, что делает их идеальным диагностическим маркером (Mongey и Hess, 1991; Von Muhlen, 1995).

Кроме того, при детекции ANA с использованием теста непрямой иммунофлуоресценции (IFA) на HEp-2 клетках рекомендуется или необходима дальнейшая иммунологическая дифференцировка (Pollock, 1999; Tan и другие, 1997) по причинам:

- различной специфичности половины (50%) IFA-положительных сывороток;
- образцы от «здоровых лиц», положительные в IFA-тесте, отрицательны при анализе диагностически значимых специфических антител;
- отрицательный IFA-тест не исключает наличия некоторых специфических антител к экстрагируемым ядерным антигенам (ENA);
- вариабельность интерпретации IFA-теста между лабораториями находится в пределах 36-51% коэффициента вариации (Tan и другие, 1997).

Превосходные чувствительность и специфичность системы иммуноблот достигаются благодаря использованию очищенных или рекомбинантных антигенов и делают этот метод важным диагностическим инструментом в клинической лаборатории для обнаружения ANA (Carey, 1997).

Наиболее распространенные ассоциированные с наличием ANA болезни:

Тип специфических антител	Ассоциированное заболевание
Jo-1	Полимиозит/дерматомиозит
Scl-70	Склеродермия
CENP-B	CREST-синдром
SS-A/RO	SS, СКВ (20-30) %, HB, РА
SS-B/LA	СКВ SS

U1-RNP

SmBB⁺, SmD

Рибосомальные белки

СКВ, СЗСС

СКВ

СКВ (иногда этот вид антител связывают с нейropsychическими заболеваниями)

Сокращения: СКВ - системная красная волчанка; СЗСС - смешанное заболевание соединительной ткани; РА - ревматоидный артрит; SS - синдром Шегрена; HB - неонатальная волчанка; CREST-синдром - синдром, включающий кальциноз (C), феномен Рейно (R), нарушение моторики пищевода (E), склеродактилию (S) и телеангиэктазию (T).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Высоко очищенные экстрагированные ядерные антигены связаны с нитроцеллюлозной мембраной в форме полосок. Антитела к этим антигенам, присутствующие в образце, связываются с мембраной. Последующая промывка удаляет несвязавшиеся антитела. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами против IgG человека, связывается со связавшимися с антигенами на мембране антителами из образца пациента, формируя иммунный комплекс конъюгат/антитела/антиген. Последующая промывка удалит несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизует с образованием нерастворимого продукта, окрашенного в синевioletовый цвет. Последующая промывка удаляет негидролизированный субстрат. Интенсивность цветной окраски каждой антигенной полоски пропорциональна концентрации антиядерных IgG-антител, присутствующих в образце.

ЗАМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- 1 Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- 2 Не смешивайте компоненты наборов из различных партий.
- 3 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 крови (цельными и разбавленными) следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- 4 Азид натрия используется в качестве консерванта в Разбавляющем буфере и Промывочном растворе. Азид натрия - высоко токсичное и активно реагирующее в чистом виде вещество. В концентрации, в которой данное вещество присутствует в реагентах набора, оно не так опасно. Несмотря на классификацию реагентов как неопасных, мы настоятельно рекомендуем следовать правилам лабораторной техники безопасности (смотрите пп 6, 7, 8).
- 5 Некоторые компоненты набора содержат Проклин 300 в качестве консерванта. Смывайте отходы большим количеством воды после использования, чтобы снизить концентрацию реагентов ниже активной.
- 6 При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
- 7 Не пипетируйте ртом.
- 8 В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить и пользоваться косметикой.

Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулы сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Нитроцеллюлозные стрипы, каждый содержит 9 очищенных или рекомбинантных антигенов и 2 контроля. Готовы для использования.	8 или 16
Разбавляющий буфер для образцов. Готов для использования.	1 флакон, 20 мл

Буферный промывочный раствор. концентрат, 50x	1 флакон, 20 мл
Ферментный конъюгат, содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие анти-IgG антитела, меченные щелочной фосфатазой (содержит фосфатно-солевой буфер, NaN_3 <0,1 % (w/w), розового цвета). Готов для использования.	1 флакон, 20 мл
Субстратный раствор. Готов для использования.	1 или 2 флакона, 5 мл
Нитроцеллюлозный калибровочный стрип (меченый CAL) для полуколичественной оценки.	1 или 2
Вместе с набором поставляются ванночки с инкубационными камерами для стрипов	1 или 2
Бланк-трафарет для учёта результатов анализа	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °С.
2. Храните стрипы в плотно закрытом пакете с осушителем.
3. Необходимо контролировать сроки годности, представленные на этикетках коробок и флаконов.
4. Не оставляйте реагенты на свету и вблизи источников тепла во время использования и хранения.
5. Разбавленный Промывочный раствор стабилен по крайней мере 30 дней при хранении при 2-8°С.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл с наконечниками
- Хронометр
- Качающаяся платформа (например, мини-рокер шейкер MR-1, за информацией о приобретении обращайтесь в ЗАО «БиоХимМак», тел.939-24-21)
- Пинцеты

Приготовление

- Дистиллированная вода
- Цилиндр на 1000 мл

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

Для анализа предпочтительна сыворотка крови. Соберите кровь асептически обычной венопункцией в стерильный вакутейнер или другим подходящим способом. После образования сгустка при комнатной температуре отделите сыворотку от клеток центрифугированием как можно скорее, чтобы избежать гемолиза.

Избегайте использования липемичных или гемолизированных сывороток.

Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8°С 5 дней. Для более длительного хранения (6 месяцев) образцы следует заморозить до -20°С.

Не рекомендуется использование инактивированной теплом сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.

Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры перед использованием (20-28°С) и хорошо перемешайте их.

Все реагенты и образцы должны быть готовы до начала анализа. Начав выполнять анализ, работайте без задержек, чтобы результаты были достоверными.

Строго следуйте указанной последовательности выполнения шагов протокола.

Всегда используйте только свежеприготовленные образцы.

Используйте одноразовые наконечники для пипеток во время анализа, чтобы избежать контаминации при внесении реагентов.

Нитроцеллюлозные стрипы необходимо брать либо в перчатках либо пинцетом.

Все инкубации должны быть строго рассчитаны по времени.

Контрольные образцы и образцы нуля сывороток анализируйте как неизвестные.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буферного 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°С по крайней мере 30 дней после приготовления или до даты, указанной на этикетке флакона.

ПРОЦЕДУРА ИММУНОБЛОТА

МЕТОДИКА

1. Осторожно вставьте стрип с помощью пинцета в инкубационную камеру, затем добавьте 1,0 мл Разбавляющего буфера для образцов в каждую камеру. Позвольте системе уравновеситься в течение 5 минут при медленном покачивании.
2. Добавьте 10 мкл сыворотки пациента прямо в инкубационную камеру (конечное разведение 1:101).
3. Инкубируйте в течение 60 минут в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
4. Осторожно полностью удалите раствор со стрипов.
5. Добавьте 2,0 мл Промывочного буфера, инкубируйте в течение 5 минут, затем удалите как в шаге 4.
6. Повторите эту процедуру дважды.
7. Добавьте 1,0 мл Ферментного конъюгата в каждую инкубационную камеру.
8. Инкубируйте в течение 30 минут в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
9. Полностью удалите раствор конъюгата со стрипа.
10. Добавьте 2,0 мл Промывочного буфера, инкубируйте в течение 5 минут, затем удалите как в шаге 4.
11. Повторите эту процедуру дважды.
12. Добавьте 1,0 мл Субстратного раствора на каждый стрип.
13. Инкубируйте в течение 10 минут в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
14. Удалите Субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой три раза, замачивая на 5 минут каждый раз для остановки реакции.
15. Осторожно просушите стрипы промакиванием на бумажном полотенце.
16. 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.

Интерпретация результатов

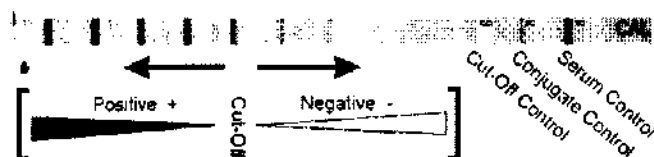
Антигены сорбированы на мембране в порядке, показанном на рисунке ниже.



Окраска полос сравнивается с окраской полос Калибровочного стрипа следующим образом:

1. Сравните полосу Cut-Off контроля на рабочем стрипе с полосой Cut-Off контроля Калибровочного стрипа.

2. Сравните полосы, сорбированные антигенами, на рабочем стрипе с калибровочными полосами на Калибровочном стрипе для полуколичественной оценки.



Замечания по интерпретации результатов пациентов:

1. Этот тест - полуколичественный анализ для определения специфических аутоантител в сыворотке пациентов, позволяющий различать отрицательные, пограничные, слабо положительные, положительные и высоко положительные результаты. Образцы с пограничными результатами необходимо проанализировать повторно или проверить альтернативными методами.

2. Сыворотка пациентов со многими аутоиммунными ревматологическими заболеваниями часто содержит специфические аутоантитела одновременно ко многим аутоантигенам. Такой конкретный образец может дать положительную реакцию с более чем одной полосой в этом анализе.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА АНТИГЕННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Данный набор ANA-9 был оценен на образцах от пациентов, содержащих антитела известной специфичности и образцах, полученных от доноров, в одном общем исследовании. Все донорские образцы дали отрицательные полосы для всех антигенных специфичностей.

КАЛИБРОВКА

Для тестирования СДС-сывороток использовался протокол, предложенный Tan и другими (1999) *Arthritis & Rheumatism* 42, 455-464.

Чувствительность, специфичность и доза/ответ ANA-9-Line Immuloblot были оценены в испытательных образцах - смесях СДС-сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известными специфичностями.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

ANA-9-Line immuloblot - тест, предназначенный для дополнительной диагностики, и не должен использоваться отдельно. Конкретный клинический диагноз не должен быть основан на результатах единственного теста, но только на оценке совокупности всех клинических и лабораторных результатов.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Не наблюдалась интерференция в образцах сыворотки с гемолизом (до 1000 мг/дл), липемичными образцами (до 3 г/дл триглицеридов) или билирубином (до 40 мг/дл). Не отмечена интерференция с наличием в образцах антикоагулянтов. Тем не менее, не рекомендуется использовать сильно гемолизированные или липемичные образцы.

- Ermens AAM, Bayens AJM, van Gemert ACM, van Duijnhoven JLP. (1997) Simple dot-blot method evaluation for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. *Clin. Chem.*, 43: 2420-2422.
- Mongey, A-B and Hess, EV (1991) Antinuclear antibodies and disease specificity. *Adv. Int Med.* 36, 151-169.
- Paxton, H., Bendele, T., O'Connor, L., & Haynes, D.C. (1990). Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to native DNA. *Clin Chem*, 36, 792-797.
- Pollock, W and Toh, BH (1999) Routine immunofluorescence detection of Ro/SSA autoantibody using Hep-2 cells transfected with human 60kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol.* 52, 684-687.
- Sturges, A. (1992) Recently characterised autoantibodies and their clinical significance. *Austr NZ, J Med.*, 22, 279-289.
- Tan, E.M., Chan, E.K., Sullivan, K.F., & Rubin, R.L. (1988). Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol.* 47, 121-141.
- Tan, E.M., Felikamp, T.E.W., Smolen, J.S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M.J. (1997) Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 40, 1601-1611.
- Tan, E.M., Smolen, J.S., McDougal, J.S., Butcher, B.T., Conn, D., Dawkins, R., Fritzler, M.J., Gordon, T., Hardin, J.A., Kalden, J.R., Lahita, R.G., Maini, R.N., Rothfield, N.F., Smeenk, R., Takasaki, Y., van Venrooij, W.J., Wiik, A., Wilson, M., & Koziol, J.A. (1999). A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum*, 42, 455-464.
- Von Muhlen CA and Tan EM (1995) Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 24, 323-358.

ЛИТЕРАТУРА

- Carey, JL. (1997) Enzyme immunoassays for antinuclear antibodies. *Clin Lab Med.* 17, 355-365.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ ANA – 9 - Line

1

Вставьте блот-стрип в инкубационную камеру.

→ **Добавьте 1000 мкл Разбавляющего буфера для образцов в инкубационную камеру.**

→ **Инкубируйте с перемешиванием в течение 5 минут.**

2

Добавьте 10 мкл сыворотки пациента и ресуспендируйте.

→ **Инкубируйте с перемешиванием в течение 60 минут.**

→ **Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по 5 минут 1000 мкл Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.**

3

Добавьте 1000 мкл Ферментного конъюгата на стрип и ресуспендируйте.

→ **Инкубируйте с перемешиванием в течение 30 минут.**

→ **Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по 5 минут 1000 мкл Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.**

4

Добавьте 500 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.

Информация для заказа

119991, Москва, Ленинские горы,

ЗАО «БиоХимМак»

тел.(095) 939-24-21, 939-2364, 932-9214,

факс(095) 939-09-97

E-mail: info@biochemmack.ru

Nucleo-9-Line

набор для полуколичественного определения антиядерных аутоантител методом иммуноблота на мембране

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Nucleo-9-Line набор, основанный на иммуноферментном анализе на мембране, для полуколичественного определения аутоантител класса IgG к ядерным антигенам: dsDNA, нуклеосома, SS-A, SS-B, RNP, Sm, центромера B, Jo-1 и Scl-70. Метод предназначен только для диагностики *in vitro* и должен использоваться только в целях диагностики ревматоидных аутоиммунных заболеваний.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Системные аутоиммунные заболевания клинически проявляются разнообразными симптомами. Их проявления в значительной степени совпадают. Для постановки правильного диагноза ревматоидных аутоиммунных заболеваний необходимо выявить пациентов с проявлениями аутоиммунитета. Присутствие аутоантител к антигенам, в норме недоступным, (цитоплазматическим, нуклеоплазмы, ядерного матрикса и ядрышек) является одним из признаков системных аутоиммунных заболеваний (Tal, 1988; Sturgess, 1992). Все в большей степени становится очевидным, что системные заболевания могут быть подразделены на основании профиля их антиядерных антител (ANA). Существует четкая корреляция между профилем ANA и специфическим заболеванием, делающая его идеальным диагностическим маркером (Mongey and Hess, 1991; Von Muhlen, 1995). Кроме того, при определении ANA методом непрямой иммунофлуоресценции (IFA, ИФА) на клетках линии HEp-2, рекомендуется и требуется дополнительная иммунологическая дифференциация (Pollock, 1999; Tan et al., 1997), по различным причинам:

- множественная специфичность 50% IFA-положительных сывороток;
- «здоровые» индивидуумы могут быть IFA-положительными, но при этом давать отрицательные результаты для диагностически значимых аутоантител
- отрицательный результат IFA не исключает наличия экстрагируемых ядерных антигенных (ENA) специфичностей
- Коэффициент вариации теста IFA в различных лабораториях составляет 36-51% (Tan et al., 1997).

Превосходная чувствительность и специфичность метода иммуноблота достигается использованием очищенных нативных или рекомбинантных антигенов и делает его важным диагностическим инструментом детекции ANA в клинической лаборатории (Carey, 1997). Ассоциация наиболее часто встречающихся антиядерных антител (ANAs) с различными заболеваниями:

Специфичность антител	Ассоциированное заболевание
dsDNA	SLE
Нуклеосомы	SLE
SS-A	SS, SLE (20-30%), NL
SS-B	SLE, SS
U1-RNP	SLE
Рибосомальный протеин Р	SLE (иногда ассоциируется с психоневрологическими заболеваниями)
Центромера В	CREST
Jo-1	полимиозит/дерматомиозит
Scl-70	склеродермия

SLE - системная красная волчанка; MCTD- смешанные заболевания соединительной ткани; RA- ревматоидный артрит; SS- синдром Шегрена; NL- неонатальная волчанка; CREST - разновидность склеродермии в виде кальциноза, синдрома Рейно, дисфункции пищевода, склеродактилии и телеангиэктазии.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые препараты антигенов иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной сыворотке, связываются с мембраной. При промывке с мембранных стрипов удаляются несвязавшиеся антитела. Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к IgG человека иммунологически связывается с антителами, присутствовавшими в сыворотке пациентов и связавшимися на мембране с антигеном. При этом образуется комплекс

- конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляются несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связавшегося конъюгата гидролизуетс с образованием нерастворимого синне-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

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не мешайте компоненты наборов из различных лотов.
3. 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 мочи следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ВСIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / р-нитро голубой тетразол хлорид. Если ВСIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он 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. В концентрациях, присутствующих в реагентах, он не токсичен. Несмотря на классификацию как истоксичного вещества, мы настоятельно рекомендуем следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).
6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.
7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.
8. Не отбирайте образцы ртом
9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить и курить

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пинстирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или пулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 или 16 тестов
Итритроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами нативных или рекомбинантных ядерных антигенов. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, <i>концентрат 50x</i>	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, $\text{NaN}_3 < 0.1 \%$ (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (ВСIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл
Предобработанные калибровочные итритроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуколичественного анализа. Готовы к использованию	1 или 2
Емкости для инкубации	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
2. Храните микропланшет в хорошо запечатанном пакете с осушителем.
3. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.
4. Не оставляйте компоненты набора или весь набор на ярко освещенном месте, под прямыми лучами солнца, не позволяйте реагентам нагреваться.
5. Разведенные буфер для промывок и буфер для образцов стабильны при 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Качающаяся платформа
- Пинцет
- Лабораторный таймер
- Приготовление реагентов**
- дистиллированная вода
- мерные цилиндры на 1000 мл

СБОР, ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови, используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования ступков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или липемичных образцов, однако ни липемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C по крайней мере 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоагглютинирующей активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование дезактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. 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.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов тестирования, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Для предотвращения переходящей контаминации меняйте наконечники при нанесении каждого нового образца и различных контролей
8. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
9. Необходимо соблюдать время всех инкубаций
10. Контрольные сыворотки или пулы должны быть проанализированы совместно с остальными образцами, при тех же условиях.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

Приготовление буфера для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным концентратом промывочного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл (20 мл концентрата и 980 мл воды) перед использованием. Храните охлажденным до 2-8°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

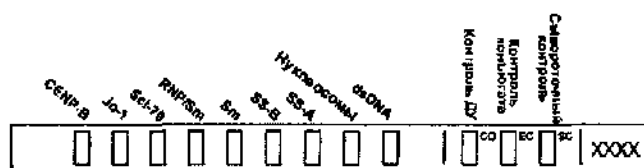
1. Используя пинцет, поместите Nucleo-9-Line стрипы и добавьте по 1.0 мл буфера для образцов в каждую камеру инкубационной емкости. Аккуратно покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.
2. Внесите по 10 мкл образцов сывороток пациентов непосредственно в камеры (конечное разведение 1:101).
3. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
4. Осторожно удалите разведенную сыворотку со стрипов, полностью.
5. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
6. Внесите по 1.0 мл ферментного конъюгата в каждую камеру. 7. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
8. Осторожно удалите ферментный конъюгат со стрипов, полностью.
9. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
10. Внесите по 1.0 мл субстрата на каждый стрип.
11. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
12. Удалите субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой, три раза по 5 минут каждый для остановки реакции.
13. Осторожно высушите стрипы с помощью фильтровальной бумаги.
14. Перед оценкой дайте стрипам высохнуть на воздухе.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Данный тест считается действительным только в случае, если Контрольная сыворотка (первая линия), контроль конъюгата (вторая линия) и контроль дискриминационного уровня (ДУ, третья линия) показали превращение субстрата с образованием окрашенных полос! Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными и тест необходимо повторить.

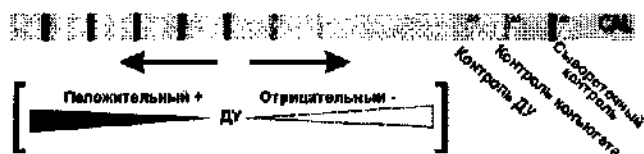
ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Антигены расположены на мембране в порядке, указанном на рисунке:



Проявившиеся линии должны сравниваться с калибровочным стрипом следующим образом:

1. Сравните линию контроля ДУ стрипа, на котором проводился анализ сыворотки пациента, с калибровочными линиями на калибровочном стрипе для корректировки.
2. Сравните линии стрипа, на котором проводился анализ сыворотки пациента, с калибровочными линиями, задавая контроль ДУ, для полуколичественного анализа.



Замечания:

1. Данный полуколичественный метод определения специфичности антител позволяет различать отрицательный, пограничный, слабо положительный, положительный и строго положительный результаты. Образцы, для которых получен пограничный результат, должны быть проанализированы еще раз этим или каким-либо альтернативным методом.
2. Сыворотка пациентов с ревматоидными аутоиммунными заболеваниями часто содержит аутоантитела нескольких специфичностей. Такая сыворотка может давать положительную реакцию больше, чем с одним антигеном (больше, чем с одной антигенной полосой).

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Оценка качества данного метода Nucleo-9 Line проводилась с тестированием сывороток пациентов с известной специфичностью и сывороток здоровых доноров, при этом использовалась стандартная процедура, описанная в данной инструкции. Все сыворотки здоровых доноров дали отрицательные результаты для всех антигенных специфичностей.

КАЛИБРОВКА

Тестирование CDC-сывороток с использованием протокола, разработанного Tan et al. (1999) Arthritis & Rheumatism 42, 455-464.

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для данного метода Nucleo-9-Line иммуноблот оценивали, используя CDC-сыворотки и внутренние контрольные сыворотки, содержащие различные относительные количества сывороток с известными специфичностями.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Данный метод Nucleo-9 Line может быть использован в диагностических целях, но окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах только данного теста, но на совокупности всех данных клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Не наблюдались 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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carey, J.L. (1997) Enzyme immunoassays for antinuclear antibodies. Clin Lab Med. 17, 355-365.
2. Ermens AAM, Bayens AJM, van Gemert ACM, van Duijnhoven JLP. (1997) Simple dot-blot method evaluation for detection of antibodies against extractable nuclear antigens. Clin. Chem., 43: 2420-2422.
3. Mongey, A-B and Hesa, EV (1991) Antinuclear antibodies and disease specificity. Adv. Int Med. 36, 151-169.
4. Paxton, H., Bendele, T., O'Connor, L., & Haynes, D.C. (1990). Evaluation of the RheumaStrip ANA profile test: a rapid test strip procedure for simultaneously determining antibodies to autoantigens U1-ribonucleoprotein (U1-RNP), Sm, SS-A/Ro, SS-B/La, and to native DNA. Clin Chem, 36, 792-797.
5. Pollock, W and Toh, BH (1999) Routine immunofluorescence detection of Ro/SSA autoantibody using Hep-2 cells transfected with human 60kDa Ro/SS-A. J Clin Pathol. 52, 684-687.
6. Sturgess, A. (1992) Recently characterised autoantibodies and their clinical significance. Austr. NZ J Med., 22, 279-289.
7. Tan, E.M., Chan, E.K., Sullivan, K.F., & Rubin, R.L. (1988). Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. Clin Immunol Immunopathol, 47, 121-141.
8. Tan, E.M., Feltkamp, T.E.W., Smolen, J.S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M.J. (1997) Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. Arthritis Rheum. 40, 1601-1611.
9. Tan, E.M., Smolen, J.S., McDougall, J.S., Butcher, B.T., Conn, D., Dawkins, R., Fritzler, M.J., Gordon, T., Hardin, J.A., Kalden, J.R., Lahita, R.G., Maini, R.N., Rothfield, N.F., Smeenk, R., Takasaki, Y., van Venrooij, W.J., Wiik, A., Wilson, M., & Koziol, J.A. (1999). A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. Arthritis Rheum, 42, 455-464.
10. Von Muhlen CA and Tan EM (1995) Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. Semin Arthritis Rheum 24, 323-358.

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

1. Положите стрип в инкубационную камеру

Внесите 1000 мкл буфера для образцов в каждую камеру инкубационной емкости. → покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.

2. Добавьте по 10 мкл образца на стрип и перемешайте

Инкубируйте 60 мин. при покачивании → Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 1000 мкл по 5 минут промывочным буфером. Удалите промывочный буфер

3. Добавьте по 1000 мкл раствора ферментного конъюгата

Инкубируйте 30 мин. при покачивании → Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 1000 мкл по 5 минут промывочным буфером. Удалите промывочный буфер

4. Добавьте по 500 мкл субстрата на стрип

Инкубируйте 10 мин. при покачивании → Удалите содержимое ячеек и трижды промойте 1000 мкл по 5 минут дистиллированной водой. Высушите стрипы. Считайте результаты только после полного высыхания.



Myositis plus

Набор для полуколичественного определения AMA-M2, Jo-1, PM-Scl-100, PL 7, PL 12, Mi-2, Ku (p70/80), SRP и Rib-P аутоантител методом иммуноблота на мембране.

Замечание от ЗАО «БиохимМак»

Уважаемые коллеги! Русская версия инструкции переведена с английского варианта. Обратите внимание на соответствие номера и даты версии английской инструкции, вложенной в набор, с русским переводом. Если версии на русском и английском языках не совпадают, обратитесь в ЗАО «БиохимМак» за исправленным русским вариантом или используйте инструкцию на английском языке.

Инструкция пользователя

НАЗНАЧЕНИЕ

Myositis plus - набор, основанный на методе иммуноблота на мембране, для полуколичественного определения митохондриальных антител M2 подтипа (AMA-M2), IgG аутоантител к ядерному и цитоплазматическому антигену Jo-1 (гистидил-тРНК синтаза), PM-Scl-100, PL 7 (треонил-тРНК синтаза), PL 12 (аланил-тРНК синтаза), Mi-2, Ku (p70/80) и SRP (частица распознавания сигнала); а также IgG аутоантител к Rib-P (рибосомальным фосфопротеинам). Метод предназначен только для диагностики *in vitro*, могут быть исследованы образцы сыворотки или плазмы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Дерматомиозит, полимиозит и миозит с включенными тельцами являются идиопатическими воспалительными заболеваниями неизвестной этиологии. Они характеризуются мышечной слабостью и атрофией проксимальной мускулатуры; прогрессия заболевания обычно подострая. Эти миопатии относятся к аутоиммунным заболеваниям.

Идиопатические миозиты часто ассоциированы с другими аутоиммунными заболеваниями и болезнями соединительной ткани или обладают схожими симптомами, что иногда делает точную диагностику затруднительной. Из примерно 90% пациентов, у которых обнаруживают антитела, у 60 % они направлены к специфическому ядерному (ANA) и/или цитоплазматическому антигенам. В 1/5 случаев антигенами-мишенями являются рибонуклеопротеины, участвующие в биосинтезе белков (тРНК-синтазы, SRP). Эти антитела указывают на интерстициальное заболевание легких (ILD).

Миозит-специфические антитела, MSA, обычно появляются только в случаях идиопатического воспалительного миозита, и являются маркером данного заболевания. Они могут выявляться перед клинической манифестацией заболевания и исчезают после успешного лечения. Миозит-ассоциированные

аутоантитела, MAA, кроме идиопатического воспалительного миозита также обнаруживаются у пациентов, страдающих другими заболеваниями.

В методе Myositis plus производства ORGENTEC Diagnostika использованы типичные и наиболее распространенные антигены для выявления MSA и MAA. Благодаря сочетанию выбранных антигенов данный тест, основанный на иммуноблоте, позволяет быстро и просто выполнять диагностику и дифференциальную диагностику идиопатического воспалительного миозита и заболеваний со схожими или аналогичными симптомами. Сочетание используемых антигенов в тесте Myositis plus также позволяет дифференцировать аутоантитела к рибосомам и митохондриям, которые демонстрируют цитоплазматический характер окрашивания методом иммунофлуоресценции.

AMA-M2

Антимитохондриальные антитела (AMA) это гетерогенная группа аутоантител, направленных к различным белкам внутренней и внешней сторон митохондриальной мембраны. AMA подтипа M2 направлены к эпитопам комплекса пируватдегидрогеназы. Высокая чувствительность и специфичность аутоантител M2 делает их прекрасным инструментом для выявления первичного билиарного цирроза (PBC).

Анти-Jo-1

Антитела к антигену Jo-1, гистидил-тРНК синтазе, являются наиболее частыми миозит-специфическими аутоантителами (MSA). У примерно 90% пациентов, у которых были выявлены анти-Jo-1, в ходе заболевания развивается миозит. Jo-1 – это цитоплазматический фермент, катализирующий связывание гистидина со специфической тРНК в процессе биосинтеза белка.

Анти-PM-Scl-100

Как миозит-ассоциированные антитела, аутоантитела к PM-Scl-100 являются важным индикатором при синдроме перекрывания миозит/склеродермия. Они могут обнаруживаться у примерно 1/4 пациентов с перекрыванием миозит/склеродермия, но в случаях склеродермии или миозита отдельно они выявляются редко, в 2 и 6 %, соответственно. Анти-PM-Scl-100 направлены к эпитопам экзосом мультиферментного комплекса, состоящего из нескольких РНК-связывающих белков и ферментов с экзорибонуклеазной функцией и играющего важную роль в процессинге РНК.

Анти-PL-7

Аутоантитела PL-7 направлены против треонил-тРНК синтазы цитоплазмы. Анти-PL-7 это миозит-специфические антитела, но они очень редки, встречаются менее чем в 3% случаев.

Анти-PL-12

Анти-PL-12 это еще одни миозит-специфические антитела к аланил-тРНК синтазе цитоплазмы. Они встречаются менее чем в 3% случаев.

Анти-Mi-2

Миозит-специфические антитела к белку Mi-2 являются диагностическим маркером идиопатического миозита. Среди больных с положительными результатами анти-Mi-2 примерно 95% страдают дерматомиозитом и 3% - полимиозитом. Антиген-мишень этих антител это

- центральный компонент мультибелкового комплекса (NuRD), катализирующего модификацию хроматиновой структуры и, таким образом, действующего как активатор или репрессор транскрипции.

Анти- μ (p70/80)

Антиген-мишень этих миозит-ассоциированных антител это Ku-антиген, АТФ-зависимая ДНК хеликаза. Антитела к Ku выявляются у примерно 7% больных с миозитами.

Они также определяются при других аутоиммунных заболеваниях, такие как SLE или синдром Шегрена.

Анти-SRP

Миозит-специфические анти-SRP антитела могут выявляться в случаях тяжелого миозита. Их встречаемость при миозитах составляет около 4%; у около 1/4 SRP-положительных пациентов обнаруживают клинические признаки дерматомиозита. Антиген-мишень этих антител это частица распознавания сигнала (SRP), цитоплазматический рибонуклеопротеиновый комплекс, ответственный за транслокацию вновь синтезированных протеинов из рибосом в эндоплазматический ретикулум.

Анти-Rib-P

- Rib-P антитела являются диагностическим маркером системной красной волчанки (SLE). Они выявляются у 10 - 20% больных SLE, в первую очередь в активной фазе заболевания; их редко обнаруживают у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями. У пациентов, страдающих склеродермией, присутствие Rib-P антител может указывать на перекрывание склеродермия/SLE. Антиген-мишень этих аутоантител это специфические регионы фосфопротеинов P0 (38 кДа), P1 (19 кДа) и P2 (17 кДа) субъединицы 60S рибосомального комплекса.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые антигены AMA-M2, Jo-1, PM-Scl-100, PL 7, PL 12, Mi-2, Ku (p70/80), SRP и Rib-P иммобилизованы на стрипах нитроцеллюлозной мембраны. Антитела к этим антигенам, присутствующие в разведенной 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, образя комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизует с образованием нерастворимого синего 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

- 1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
- 2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов.
- 3. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы методами, одобренными FDA, на отсутствие HBsAg, HCV, HIV1 и HIV2. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами данного набора, содержащими компоненты человеческого происхождения, следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.

4. Избегайте контакта с BCIP/NBT (5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат / p-нитро голубой тетразол хлорид. Если BCIP/NBT попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.

5. Некоторые компоненты набора (например, контроли, буфер для образцов, буфер для промывок) содержат азид натрия (NaN_3) в качестве консерванта. Он 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. В концентрациях, присутствующих в реагентах (0.09%), он не токсичен. Несмотря на классификацию как не токсичного вещества, настоятельно рекомендуется следовать обычной лабораторной практике обращения с опасными веществами (см. 7, 8, 9).

6. Некоторые компоненты набора содержат Proclin 300 в качестве консерванта. При выливании реагентов, содержащих Proclin 300, необходимо смывать большим количеством воды для разведения компонентов до уровня ниже активного.

7. При обращении с образцами используйте одноразовые перчатки, а после работы тщательно мойте руки.

8. Не ингалируйте ртом

9. В помещении, где работают с образцами или компонентами набора, нельзя есть, пить, курить или пользоваться косметикой.

Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов пипетирования, приведенную в этой инструкции. Посмотрите руководства по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях и используйте в постановках контроля и/или нулов сыворотки.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Формат набора	8 / 16 тестов
Нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными на них особо чистыми препаратами антигенов AMA-M2, Jo-1, PM-Scl-100, PL 7, PL 12, Mi-2, Ku (p70/80), SRP и Rib-P. Готовы к использованию.	8 или 16
Буфер для образцов, готов к использованию. Данный буфер специально разработан для набора Myositis plus и не может быть заменен буфером для образцов из других наборов для иммуноблотов.	1 флакон 20 мл
Буфер промывочный, <i>концентрат 50x</i>	1 флакон 20 мл
Раствор (PBS, NaN_3 <0.1 % (w/w)) ферментного конъюгата (розовый), содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Готовы к использованию.	1 флакон 20 мл
Раствор субстрата (BCIP/NBT). Готов к использованию.	1 или 2 флакона, 5 мл
Предобработанные калибровочные нитроцеллюлозные стрипы (обозначены «CAL») для полуколичественного анализа. Готовы к использованию.	1 или 2
Емкости для инкубации	1 или 2
Листы данных. Готовы к использованию.	1 или 2

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- 1. Все реагенты должны храниться при 2 - 8 °C в их оригинальной упаковке
- 2. Храните нитроцеллюлозные стрипы в хорошо запечатанном пластиковом контейнере, с осушителем.
- 3. Важно: Калибровочный стрип очень чувствителен к свету. Пожалуйста, храните его в темноте.
- 4. Реагенты стабильны вплоть до истечения срока годности.

дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Пипетки на 10, 500 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пипет

Приготовление реагентов

- дистиллированная вода
- мерный цилиндр на 1000 мл

СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови используя обычную медицинскую технику забора крови, избегая гемолиза.
2. Отделите сыворотку от клеток центрифугированием после образования сгустков.
3. Следует избегать тестирования гемолизных или лимфатических образцов, однако ни лимемия, ни гемолиз не оказывают существенного влияния на анализ.
4. Образцы могут храниться при охлаждении до 2 - 8 °C до 5 суток. Для более длительного хранения (до шести месяцев) образцы следует заморозить до -20°C.
5. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания, это может привести к значительному снижению аутоантителной активности.
6. Не рекомендуется проводить тестирование деактивированных нагреванием образцов сыворотки.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО МЕТОДИКЕ

1. Не используйте компоненты набора после истечения срока их годности.
2. Не меняйте компоненты наборов из различных лотов
3. Позвольте всем компонентам набора и образцам достичь комнатной температуры (20-28°C) перед использованием и хорошо перемешайте их.
4. 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.
5. Пожалуйста, строго соблюдайте последовательность шагов, приведенную в этой инструкции
6. Всегда используйте свежеприготовленные разведения образцов
7. Для избежания перекрестной контаминации меняйте наконечники при переносе каждого нового образца и различных контролей
8. С нитроцеллюлозными стрипами необходимо работать в перчатках или с помощью пинцета.
9. Необходимо точно соблюдать время всех инкубаций
10. Контрольные сыворотки или пузы должны всегда анализироваться совместно с остальными образцами, при тех же условиях, для проверки качества выполнения методики и реагентов.
11. 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

Приготовление буфера для промывок

Разбавьте содержимое каждого флакона с 50-кратным количеством концентрированного буфера дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните охлажденным: буфер стабилен при 2-8°C по крайней мере 30

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Используйте пинцет, поместите стрип Myositis plus и добавьте по 1.0 мл буфера для образцов в каждую камеру инкубационной емкости. Аккуратно покачивайте в течение 5 минут для равномерного распределения.
2. Внесите 10 мкл образца сыворотки пациента непосредственно в камеру (конечное разведение 1:101).
3. Инкубируйте 60 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
4. Осторожно полностью удалите разведенную сыворотку со стрипов.
5. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
6. Внесите по 1.0 мл ферментного конъюгата в каждую камеру.
7. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
8. Осторожно полностью удалите ферментный конъюгат со стрипов.
9. Внесите по 2.0 мл буфера для промывок, инкубируйте 5 минут, затем удалите, как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
10. Внесите по 1 мл субстрата на каждый стрип.
11. Инкубируйте 10 минут при комнатной температуре, аккуратно покачивая на качалке.
12. Удалите субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой, по 1.0 мл три раза по 5 минут каждый, для остановки реакции.
13. Осторожно высушите стрипы (промокните) фильтровальной бумагой.
14. Перед оценкой дайте стрипам высохнуть на воздухе.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если Контрольная сыворотка (первая линия), контроль конъюгата (вторая линия) и контроль дискриминационного уровня «Cut-Off» (третья линия) демонстрируют преобразование субстрата в виде образовавшихся бэндов! Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными и тестирование должно быть повторено.

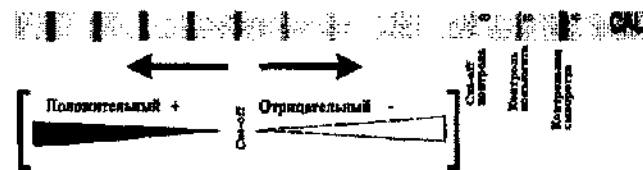
Інтерпретація результатів

Антигены расположены на мембране в порядке, указанном на рисунке:



Стрип, инкубированный с образцом сыворотки пациента (тест-стрип) с проявившимися окрашенными полосами сравнивают с калибровочным стрипом:

1. Сравните бенд контроля «Cut-Off» тест-стрипа с калибровочными бендами калибровочного стрипа для корректировки.
2. Для полуколичественного определения сравните бенды на тест-стрипе с калибровочными бендами калибровочного стрипа, скорректированными по контролю «Cut-Off».



Замечания по интерпретации результатов:

Данный полуколичественный метод определения специфических аутоантител в образцах сывороток пациентов позволяет различать отрицательный, пограничный, слабо положительный, положительный и строго положительный результаты. Образцы с пограничными результатами должны быть протестированы еще раз этим или альтернативным методом.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Набором Myositis plus протестировали образцы сывороток пациентов с известной специфичностью и доноров крови, используя обычную процедуру метода. Для всех доноров крови были получены отрицательные результаты для всех специфических антигенов.

КАЛИБРОВКА

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота Myositis plus оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Myositis plus может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностиком. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатов клинического и лабораторного обследований.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

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.

ЛИТЕРАТУРА

См. английскую инструкцию.

**119991, Москва, Ленинские горы,
ЗАО БиоХимМак
Тел. (495) 647-2740 (многоканальный),
9392421, 9395808,
факс (095) 939-09-97.
e-mail: info@biochemmack.ru**

СХЕМА ИНКУБАЦИИ

