

## НАБОР

# ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ТКАНИ СЕРДЦА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ МЕТОДОМ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

### 1101H, Anti-Heart Antibody IFA

Каталог. № : 1101H

Методика от 08-2002

Количество : 96

Производитель: *Immco Diagnostics*



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

### НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для определения и полуколичественного анализа антител к ткани сердца в человеческой сыворотке у пациентов при миокардите или кардиомиопатии методом непрямой иммунофлюоресценции.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Присутствие антител к ткани сердца было показано у пациентов с доказанным биопсией диагнозом миокардит, кардиомиопатия и, в меньшей степени, у пациентов с ишемической болезнью сердца. Анализ сывороток здоровых людей дает отрицательные результаты. Кроме того, проведенные исследования позволяют предположить наличие связи антител к ткани сердца с бактериальной или вирусной инфекцией. Стандартизированный непрямой иммунофлюоресцентный метод (IF) на ткани сердца примата, человека или грызуна является простым, не инвазивным тестом для идентификации пациентов, которые могут иметь иммуно-опосредованную сердечную дисфункцию<sup>1-6</sup>. Специфические аутоантитела к ткани сердца выявляются у примерно 25% пациентов с диагнозом распространенная кардиомиопатия<sup>4</sup>. Уровень антител к ткани сердца снижается во время прогрессии заболевания. Это говорит о том, что антитела к ткани сердца могут быть предшественниками заболевания.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный тест основан на методе непрямой иммунофлюоресценции, оптимально подготовленные препараты ткани, поставляемые с набором, инкубируют с образцами сывороток пациентов, позволяя антителам связываться с субстратом. Все несвязавшиеся компоненты сыворотки удаляют при промывке. Связавшиеся антитела класса IgG выявляют, инкубируя субстрат с конъюгат-мечеными флуоресцентной меткой (FITC) антителами к IgG человека. Результат реакции наблюдают с помощью флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующими фильтрами<sup>7</sup>. Присутствие антител к ткани сердца характеризуется фибриллярной, сарколеммой и диффузной цитоплазматической реакциями.

### РЕАГЕНТЫ

#### Хранение и подготовка

Храните все реагенты при 2-8 °С. Не замораживайте.

Все реагенты должны достигнуть комнатной температуры 20-25 °С перед использованием.

#### Реагенты, поставляемые в наборе

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

8 х 6-луночных слайдов с тканью сердца крысы (субстратом)

1 х 0.5 мл Положительный контроль\*

1 х 0.5 мл Отрицательный контроль\*

1 х 5.0 мл Конъюгат антител к IgG человека с флуоресцентной меткой (FITC). Готов к использованию. **Хранить в защищенном от света месте\***.

1 х 60 мл Буфер для разведения. Готов к использованию\*.

2 пробирки PBS. Растворить содержимое каждой в 1 литре.

1 х 5.0 мл Заключаящая среда. **Не замораживать!**\*

1 х 1.0 мл Краситель.

12 х Покровных стекол.

\***Внимание** – реагенты содержат <0.1% NaN<sub>3</sub>

### Необходимые, но не поставляемые материалы и оборудование

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

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Все использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HTLV-I, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом. Следуйте правилам техники безопасности, установленным в вашей лаборатории для работы, хранения и утилизации потенциально опасного биологического материала.

**ВНИМАНИЕ:** Азид натрия (NaN<sub>3</sub>) способен образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с медью или свинцом. При использовании реагентов, содержащих азид натрия необходимо наличие большого количества воды. Азид натрия может быть токсичен при попадании внутрь организма. Если азид натрия попал внутрь, необходимо сразу же сказать об этом руководителю лаборатории или в центр контроля за ядами.

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

### СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ

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

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

Не допускайте повторных циклов замораживания-оттаивания образцов.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

#### Тестовый метод

##### А. Скрининг:

1. Разведите каждый образец сыворотки пациента в соотношении **1:10** буфером для разведения (0.1 мл сыворотки + 0.9 мл буфера для разведения). **Не разводите Положительный и отрицательный контроли!** Сохраните не разведенную сыворотку для того, чтобы иметь возможность определить титр антител, если скрининговый тест даст положительный результат.
2. Позвольте пакету, содержащему слайды, достичь комнатной температуры в течение 10-15 минут, а затем вскройте его и аккуратно достаньте слайд(ы), не прикасаясь к субстрату.
3. Пометьте слайды и поместите их в инкубационную камеру, содержащую фильтровальную бумагу, смоченную в воде, для предотвращения высыхания субстрата.
4. Переверните флакон с капельницей и аккуратно нанесите 1 каплю (примерно 50 мкл) Отрицательного контроля в лунку № 1. Действуйте аналогично, нанесите 1 каплю Положительного контроля в лунку № 2. Избегайте переполнения лунок.
5. Используя микропипетки или пастеровские пипетки, нанесите по одной капле разведенных образцов сывороток пациентов (приблизительно по 50 мкл) в соответствующие лунки.
6. Поместите крышку на инкубационную камеру и инкубируйте слайды в течение 30 минут при комнатной температуре.
7. Достаньте слайды из инкубационной камеры и аккуратно промойте в примерно 10 мл PBS, используя пипетку или бутылку для промывок. Направляйте струю PBS вдоль середины слайда.

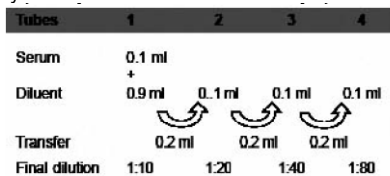
8. Прижмите край слайда к фильтровальной бумаге для удаления излишков PBS. Поместите слайды в инкубационную камеру. Немедленно переверните флакон с капельницей, содержащей конъюгат, и нанесите каплю (приблизительно 50 мкл) в каждую лунку.
9. Повторите **Шаг 7 и Шаг 8** для каждого слайда.
10. Поместите крышку на инкубационную камеру и инкубируйте слайды в течение 30 минут при комнатной температуре.
11. Достаньте слайд из камеры. Держа слайд за матовую сторону, погрузите его в стакан, содержащий PBS, для удаления избытка конъюгата. Перенесите слайд в сосуд Коплина или другую емкость, наполненную PBS, на 10 минут. Повторите для остальных слайдов. **ВНИМАНИЕ:** недостаточная или неправильная промывка ведет к увеличению фонового окрашивания.
12. Достаньте слайды из емкости. Промокните край слайда о фильтровальную бумагу для удаления избытка PBS. **Для предотвращения высыхания слайда переходите немедленно к шагу 13, пока слайд еще влажный.**
13. Закройте слайд покровным стеклом. Нанесите 3 капли Заключающей среды, равномерно распределяя их на покровном стекле, и переверните слайд на покровное стекло. Для удаления пузырьков аккуратно надавите вдоль краев покровного стекла. Избегайте сдвига покровного стекла.
14. Повторите **Шаг 12 и Шаг 13** для каждого слайда.
15. Оцените специфическую флуоресценцию с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении **200x** или более. Присутствие антифэдингового агента в заключающей среде позволяет увеличить поле зрения без ощутимой потери интенсивности окрашивания. Слайды могут быть оценены немедленно после приготовления. Кроме того, благодаря присутствию антифэдингового агента в заключающей среде не наблюдается значительного снижения интенсивности окрашивания даже если оценка будет произведена позднее. Готовые слайды должны храниться в темноте при температуре 2-8°C.

#### В: Титрование (Определение конечной точки)

Сыворотка, показавшая положительный результат при скрининговом тестировании, может быть изучена еще раз для определения титра, следуя с шага 5 до шага 13. Каждая постановка должна включать соответствующие положительные и отрицательные контроли. Сделайте серийные двукратные разведения, начиная с разведения в соотношении 1:10. При использовании одного слайда, одна сыворотка может быть протестирована в разведениях от 1:20 до 1:320. Если она остается положительной и при разведении 1:320, титр определяется как больше или эквивалентный 320, или могут быть использованы дополнительные слайды для получения конечной точки той сыворотки, которая оставалась положительной при разведении 1:320. Титром является величина, обратная максимальному разведению сыворотки, еще дающему положительный результат.

#### Приготовление серийного разведения

Пронумеруйте пробирки от 1 до 4. Внесите 0.9 мл буфера для разведения в пробирку № 1 и по 0.2 мл буфера для разведения в пробирку с номерами 2 - 4. Внесите 0.1 мл не разведенной сыворотки в пробирку 1 и тщательно перемешайте. Перенесите 0.2 мл раствора из пробирки 1 в пробирку 2 и тщательно перемешайте. Продолжайте переносить по 0.2 мл раствора из одной пробирки в следующую, после тщательного перемешивания, для получения разведений, как это показано на рисунке ниже:



#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

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

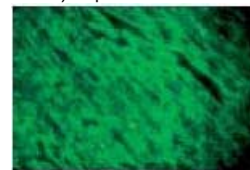
#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты тестирования на антитела к ткани сердца должны быть оценены как отрицательные (<10) или положительные с соответствующим титром. Оцените специфическое окрашивание ткани сердца. Органоспецифические антитела к ткани сердца дают четкую полосатую IF реакцию на ткани сердца, но либо отрицательную, либо слабоположительную реакцию на ткани скелетной мышцы<sup>9</sup>.

Приведенные ниже два основных типа ассоциированы с миокардитом:

1) фибриллярное

2) сарколеммное



Следует помнить, что невысокий уровень антител к ткани сердца может встречаться у людей в отсутствии сердечных заболеваний. Антитела ко многим другим тканям, например, антиядерные антитела (ANA), антимитохондриальные антитела (AMA) также могут выявляться в ткани сердца. Сыворотка, реагирующая с ядерными антигенами, может быть протестирована на клетках линии HEp-2 и печеночном субстрате. Сыворотки, проявляющие реактивность в отношении ткани гладкой мускулатуры или митохондриальное окрашивание, должны быть протестированы на субстрате мышинной почки/желудка.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

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

#### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Частота обнаружения антикардиальных антител при различных патологиях:

диагноз	% положительных
Миокардит/перимيوкардит	60-100
Перикардит	30-100
Пересадка сердца	65-100
Обширная кардиомиопатия	35-80
Практически здоровые люди	10-30



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул. Чорновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»