

## НАБОР

# ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ АМА-M2, Sp 100, gp 210, АНТИ-SLA/LP, АНТИ-LKM, АНТИ-LC1, АНТИ-F-АКТИН, АНТИ-ДЕСМИН И АНТИ-МИОЗИН МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТА НА МЕМБРАНЕ

### ORG 721, Liver-9-Line

Каталог. № : **ORG 721**

Методика от **02-2011**

Количество : **96**

Производитель: **Orgentec (Германия)**



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

## НАЗНАЧЕНИЕ

Liver-9-Line - набор, основанный на методе иммуноблота на мембране, для полуколичественного определения митохондриальных антител M2 подтипа (АМА-M2), растворимых ядерных белков (Sp100), интегрального мембранного гликопротеина (gp210), 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-9-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 большей 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 I 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-9-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.

## АМА-M2

Антимитохондриальные антитела (АМА) это гетерогенная группа аутоантител, направленных к различным белкам внутренней и внешней сторон митохондриальной мембраны. АМА подтипа M2 направлены к эпитопам комплекса пируват дегидрогеназы. Высокая чувствительность и специфичность аутоантителM2 делает их прекрасным инструментом для выявления первичного билиарного цирроза (PBC). АМА определяются в 90 - 95% случаев у больных PBC; выявление значительно повышенного титра АМА (>1:40 методом непрямой

иммунофлуоресценции) это достоверный признак PBC. АМА также определяются у примерно 25% больных АИГ, хотя в этих случаях титры обычно низкие.

## Антитела к sp100

Существует много доказательств тому, что SP100-антитела (отображающие четкий шаблон окрашивания ядерной точкой, IFA) весьма специфичны (специфичность 97%) для первичного желчного цирроза печени (PBC), и могут быть найдены у 31% пациентов с PBC. Кроме того, SP100 можно найти почти у каждого второго (48%) АМА-отрицательного пациента с клиническими и гистологическими подтверждениями PBC. Поэтому SP100 представляет собой дополнительный важный маркер наряду с АМА. Таким образом, одновременное обнаружение обоих, АМА и SP100, является весьма специфичным для PBC. Напротив, при аутоиммунном гепатите (АИГ) 1, 2 и 3 типа или при первичном склерозном холангите (PSC), SP100 антитела редко присутствуют. Наконец, появление SP100 при ревматоидном артрите (3%), системной красной волчанке (до 10%), системной склеродермии (5%) и, наконец, у пациент с Sjörger-Syndrom (2%), наблюдалось.

## Антитела к gp210

Общепризнано, что gp210 (отображение ядерной картины окрашивания мембраны в IFA) весьма специфичны для PBC и обнаруживаются в 21-41% у пациентов с PBC. Кроме того, в 21 - 47% случаев АМА-отрицательных и клинически подтвержденных PBC, gp210 наблюдается. Специфичность колебалась до 99,5%, тогда как при аутоиммунном гепатите, ревматоидном артрите, полимиозите, или у пациентов с Sjörger Syndrom, gp210 наблюдается редко. В конце концов, gp210 антитела, связанные с дополнительными проявлениями заболеваний печени, такими как артрит, и как только они определяются, неблагоприятное протекание PBC может ожидаться.

## Антитела к SLA/LP

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

## Антитела к LKM-1

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

## Антитела к LC-1

Антитела к цитозольному антигену (1 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 формиминотрансфераза циклодеаминаза (FTCD).

## Анти-SMAs

Анти-SMAs это антитела к гладкой мускулатуре. Они являются типичными маркерами АИГ-1. SMA антитела выявляются у 87 % больных АИГ, 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 1 типа АИГ, преимущественно выявляются антитела к F-актину.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Особо чистые антигены АМА-M2, sp100, gp210, 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, образуя комплекс конъюгат/антитела/антиген. При промывке с мембранных стрипов удаляется несвязавшийся конъюгат. Ферментный субстрат, в присутствии связавшегося конъюгата, гидролизует с образованием нерастворимого сине-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 ( $\text{NaN}_3$ ) 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 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

|  |                        |
|--|------------------------|
| Нитроцеллюлозные стрипы, каждый содержит очищенные или рекомбинантные антигены. Готовы для использования.  | 8 или 16               |
| Разбавляющий буфер для образцов. Готов для использования.  | 1 флакон, 20 мл        |
| Буферный промывочный раствор, <b>концентрат</b> , 50x  | 1 флакон, 20 мл        |
| Ферментный конъюгат, содержащий поликлональные кроличьи анти-человеческие анти-IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой (содержит фосфатно-солевой буфер, $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ (w/w), розового цвета). Готов для использования. | 1 флакон, 20 мл        |
| Субстратный раствор BCIP/NBT. Готов для использования.   | 1 или 2 флакона, 10 мл |
| Нитроцеллюлозный калибровочный стрип (меченый CAL) для полуколичественной оценки.  | 1 или 2                |
| 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 °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°C по крайней мере 30 дней после приготовления или до срока годности, указанного на этикетке.

## ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

### Оборудование

- Пипетки на 10 и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Качающаяся платформа
- Пинцеты

### Приготовление реагентов

- Дистиллированная или деионизированная 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 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 аутоантительной 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 избегания 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 инкубации
10. Контрольные сыворотки или пулы 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 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 ИММУНОБЛОТА

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. Повторите эту процедуру дважды.
6. Добавьте 1,0 мл Ферментного конъюгата в каждую инкубационную камеру.
7. Инкубируйте в течение 30 минут в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.

8. Полностью удалите раствор конъюгата со стрипа.
9. Добавьте 2.0 мл Промывочного буфера, инкубируйте в течение 5 минут, затем удалите как в шаге 4. Повторите эту процедуру дважды.
10. Добавьте 1.0 мл Субстратного раствора на каждый стрип.
11. Инкубируйте в течение 10 минут в условиях медленного покачивания при комнатной температуре.
12. Удалите Субстрат и промойте стрипы дистиллированной водой три раза, замачивая на 5 минут каждый раз для остановки реакции.
13. Осторожно просушите стрипы промакиванием на бумажном полотенце.
14. Позвольте стрипам полностью высохнуть на воздухе перед оценкой результатов.

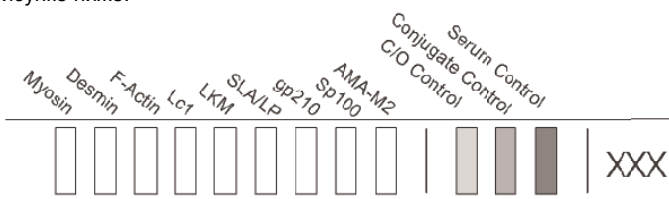
## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 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.

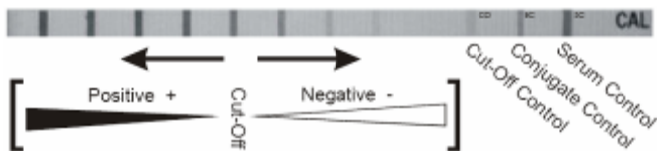
### Интерпретация результатов

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.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

### 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

Чувствительность, специфичность и зависимость от дозы для метода иммуноблота Liver-9-Line оценивались с использованием внутренних контрольных сывороток, содержащих различные относительные количества сывороток с известной специфичностью.

### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Liver-9-Line может быть использован в диагностических целях, но сам по себе не является диагностическим. Окончательный клинический диагноз не должен основываться только на результатах данного теста, но должен быть поставлен врачом после получения результатом клинического и лабораторного обследований.

### 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 гемолизованные или липемичные образцы.



### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 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»

## СХЕМА ИНКУБАЦИИ

- 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** со **2000 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** со **2000 мкл** Промывочного буфера, удалите Промывочный буфер.
- 4 Добавьте **1000 мкл** Субстрата на стрип
  - Инкубируйте с перемешиванием в течение **10 минут**
  - Удалите реакционную смесь и промойте 3 раза по **5 минут** со **1000 мкл** **дистиллированной воды**, высушите блот-стрип.

Считайте результаты только после полного высыхания стрипа.