НАБІР

ДЛЯ ЯКІСНОГО ТА НАПІВКІЛЬКІСНОГО ВИЯВЛЕННЯ ЕНДОМІЗІАЛЬНОГО АНТИТІЛА (EMA) В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЛЮДИНИ МЕТОДОМ НЕПРЯМОЇ ІММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ

1114A-PDA, Anti-Endomysial Antibody Test

*Каталог. №: **1114A-PDA*** *Методика від **02-2012***
*Кількість : **48***
*Виробник : **Immco Diagnostics***
(Австрія)

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

ПРИЗНАЧЕННЯ
Тест непрямої імунофлюоресценції антитіла для якісного та напівкількісного виявлення ендомізіальних антитіл (EMA) в сироватці крові людини в якості допомоги в діагностиці целіакії і герпетиформного дерматиту.

КОРОТКИЙ ОПИС І ПОЯСНЕННЯ *(Див. Оригінал інструкції).*

ПРИНЦИП МЕТОДУ
Даний тест заснований на методі непрямої імунофлюоресценції. Оптимально підготовлені препарати тканини, що поставляються з набором, інкубують із зразками сироваток пацієнтів, дозволяючи антитілам зв'язуватися з субстратом. Всі незв'язані компоненти сироватки видаляють при промиванні. Пов'язані антитіла класу IgG або IgA виявляють, інкубуючи субстрат з кон'югат-міченими флуоресцентною міткою антитілами. Результат реакції спостерігають за допомогою флуоресцентного мікроскопа, обладнаного відповідними фільтрами. Присутність EMA демонструється флюоресценцією зеленого кольору. Титри потім визначаються тестуванням серійних розведень.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОДУКЦІЮ
Зберігання та підготовка
Зберігайте всі реагенти при 2-8 °C. Реагенти готові до використання після досягнення кімнатної температури.

Реагенти, що поставляються в наборі
Набір містить достатню кількість реагентів, необхідних для проведення 48 визначень.

8 x	**6-лункові слайди Субстрату Дистального Відділу Стравоходу Примата** (1114A-PDE, 1114G-PDE)
25 x	**10-лункові слайди Субстрату Дистального Відділу Стравоходу Примата** (1114A-PDE250)
1 x 0.5 мл	**Позитивний Контроль EMA.** Містить сироватку людини
1 x 0.5 мл	**Негативний Контроль.** Містить сироватку людини
1 x 5 мл	**Кон'югат анти-людського IgA з FITC.** Містить Синій контрастний барвник Евана. **Захищати від світла.** (3 x 5 мл - 1114A-PDE250)
1 x 5 мл	**Кон'югат анти-людського IgG з FITC.** Містить Синій контрастний барвник Евана. **Захищати від світла.**
1 x 60 мл	**Розчинник для зразків** (2 x 60 мл - 1114A-PDE250)
2 x	**Фосфатно-сольовий буфер** (PBS). Розчиніть кожен флакон до 1 літра. (3 x 1114A-PDE250)
1 x 5.0 мл	**Середовище для заливання*.** Не заморожувати! (3 x 5 мл -1114A-PDE250)
1 x 12	**Покривні** (3 x 12 - 1114A-PDE250)

Щоб замовити Кон'югат та Контрастний Барвник у вигляді окремих компонентів, додати "X" наприкінці номера набору (наприклад, 1114A-PDEX)

Додаткові компоненти

1 x 5мл	Кон'югат анти-людського IgG з FITC. Захищати від світла. (3 x 5 мл -1114A-PDE250X)
1 x 5 мл	Кон'югат анти-людського IgG з FITC. Захищати від світла.
1 x 1.0 мл	Синій контрастний барвник Евана.

*Містить < 0.1% NaN_3

Необхідні, але не надані матеріали та обладнання
- Флюоресцентний мікроскоп
- Мікропіпетка або пастерівська піпетки
- Серологічні піпетки
- Ємність для фарбування (наприклад, посудина Копліна)
- Невеликі пробірки (наприклад, 13 x 75 мм) і підставка для них
- Дистильована або деіонізована вода
- Контейнер ємністю 1 літр
- Бутель для зберігання Буфера для промивок
- Фільтрувальний папір
- Інкубаційна камера

ЗАСТЕРЕЖЕННЯ
Для використання в *in-Vitro* діагностиці. Всі використані сироватка або плазма тестувалися методом, затвердженим FDA, і знайдено, що вони не містять антитіл до ВІЛ-1/2, HTLV-I, HCV і HBsAg. Проте, так як не існує методу, що дає повну гарантію відсутності ВІЛ, HCV, вірусу гепатиту В або яких-небудь інших інфекційних агентів, то з даними реагентами треба поводитись як з потенційно інфекційно небезпечним матеріалом. Слідуйте правилам техніки безпеки, встановленим у вашій лабораторії для роботи, зберігання та утилізації потенційно небезпечного біологічного матеріалу.
УВАГА: Азид натрію (NaN_3) здатний утворювати вибухонебезпечні з'єднання при тривалому контакті з міддю або свинцем. При використанні реагентів, що містять азид натрію, необхідна наявність великої кількості води. Азид натрію може бути токсичний при попаданні всередину організму. Якщо азид натрію потрапив всередину, необхідно відразу ж сказати про це керівнику лабораторії або повідомити в центр контролю за отрутами.
Необхідно в точності слідувати цій інструкції, це є необхідною умовою отримання точних достовірних результатів. Не змішуйте і не міняйте компоненти різних наборів, навіть якщо вони мають однаковий каталожний номер. Для запобігання мікробного або перехресного забруднення при роботі з реагентами дотримуйтесь правил, встановлених у вашій лабораторії. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці упаковки.

ЗБІР І ПРИГОТУВАННЯ ЗРАЗКА ОБРАЗЦОВ
Даний метод призначений тільки для аналізу зразків сироватки. Гемоліз, ліпемія або мікробне забруднення впливають на якість проведеного аналізу, тому такі зразки не можна використовувати для досліджень. Зразки можуть зберігатися перед аналізом при температурі 2-8 °C протягом одного тижня. Якщо зразки будуть проаналізовані пізніше, їх необхідно заморозити при -20 °C. Не допускайте повторних циклів заморожування-відтавання зразків.

ПРОЦЕДУРА
Тестовий метод
A. Скринінг:
1. Розведіть кожен зразок сироватки пацієнта в співвідношенні 1:2.5 Розчинником для Зразків (0.2 мл сироватки + 0.3 мл Розчинника). Не розводити Позитивний і Негативний контролі. Зберігайте нерозведену сироватку для того, щоб мати можливість визначити титр антитіл, якщо скринінговий тест дасть позитивний результат.
2. Дозвольте пакету, який містить слайди, досягти кімнатної температури протягом 10-15 хвилин, а потім розкрийте його і акуратно дістаньте слайд (и), не торкаючись до субстрату.
3. Позначте слайди і помістіть їх в інкубаційну камеру, яка містить фільтрувальний папір, змочений у воді, для запобігання висихання субстрату.
4. Переверніть флакон з крапельницею і акуратно нанесіть 1 краплю (приблизно 50 мкл) Негативного Контролю в лунку № 1. Діючи аналогічно, нанесіть 1 краплю Позитивного Контролю в лунку № 2. Уникайте переповнення лунок.
5. Використовуючи мікропіпетки або Пастерівські Піпетки, нанесіть по одній краплі розведених зразків сироваток пацієнтів (приблизно по 50 мкл) у відповідні лунки. Уникайте переповнення лунок.
6. Помістіть кришку на інкубаційну камеру і інкубуйте слайди протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

7. Дістаньте слайди з інкубаційної камери і акуратно промийте в приблизно 10 мл PBS, використовуючи піпетку, або прополоскайте слайд в хімічному стакані, наповненому PBS. Не використовуйте бутель. Перемістіть слайд відразу в посудину Копліна банку і промийте 10 хвилин. Повторіть процес з усіма іншими слайдами.
8. Видаліть слайд(и) з посудини Копліна. Промокніть край слайда на паперовий рушник, щоб видалити зайвий PBS. Помістіть слайд в інкубаційну камеру. Відразу інвертуйте крапельницю з кон'югатом і акуратно стисніть, щоб додати по 1 краплі (приблизно 0.05 мл) у кожну лунку.
9. Повторіть **Крок 7 і Крок 8** для кожного слайда.
10. Помістіть кришку на інкубаційну камеру і інкубуйте слайди протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
11. Дістаньте слайд з камери. Тримаючи слайд за кінець, занурте його в склянку, що містить PBS, для видалення надлишку кон'югата. Перенесіть слайд в посудину Копліна або іншу ємність, наповнену PBS, на 10 хвилин. Якщо використовується опція кон'югату без контрастного барвника (див. додаткові компоненти в розділі Матеріали, що постачаються), 2-3 краплі блакитного контрастного барвника Евана можуть бути додані до остаточної промивки. Повторіть ці дії для решти слайдів. ПРИМІТКА: Неправильна промивка може привести до збільшення фонової флюоресценції.
12. Дістаньте слайди з ємності. Промокніть край слайда на фільтрувальний папір для видалення надлишку PBS. **Для запобігання висихання слайда переходьте негайно до кроку 13, поки слайд ще вологий.**
13. Закрийте слайд покривним склом. Нанесіть **3 краплі** Середовища для Заливання, рівномірно розподіляючи їх на покривному склі, і переверніть слайд на покривне скло. Для видалення пухирців акуратно натисніть уздовж країв покривного скла. Уникайте зсуву покривного скла.
14. Повторіть Крок 12 і Крок 13 для кожного слайда.
15. Оцініть специфічну флюоресценцію за допомогою флюоресцентного мікроскопа при збільшенні 200x або більше. Слайди можуть бути оцінені негайно після приготування. Крім того, завдяки присутності антіфедінгового агента у Середовищі для заливання не спостерігається значного зниження інтенсивності фарбування навіть, якщо оцінка буде зроблена пізніше. Готові слайди повинні зберігатися в темряві при температурі 2-8 °C.

B: Визначення кінцевої точки (Титрування)
Сироватка, яка показала позитивний результат при скринінговому тестуванні, може бути вивчена ще раз для визначення титру, проводячи кроки з 5 до 13. Кожна постановка повинна включати відповідні Позитивні і Негативні Контролі. Зробіть серійні дворазові розведення, починаючи з розведення в співвідношенні 1:2.5. Титром є величина, зворотна максимальному розведенню сироватки, при якому отримується позитивний результат.

Приготування серійного розведення
Пронумеруйте пробірки від 1 до 4. Внесіть 0.4 мл Буфера для Розведення в пробірку № 1 і по 0.2 мл Буфера для Розведення в пробірки з номерами 2 - 4. Внесіть 0.2 мл НЕ розведеної сироватки в пробірку 1 і ретельно перемішайте. Перенесіть 0.2 мл розчину з пробірки 1 в пробірку 2 і ретельно перемішайте. Продовжуйте переносити по 0.2 мл розчину з однієї пробірки в наступну, після ретельного перемішування, для отримання розведень, як це показано на малюнку нижче:

Пробірки	**1**	**2**	**3**	**4**
Сироватка	0.2 ml			
Буферний розчинник	+ 0.3 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Перемістити		0.2 ml	0.2 ml	0.2ml
Кінцеве розведення	1:2.5	1:5	1:10	1:20 etc.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ
Обидва Позитивний і Негативний Контролі повинні аналізуватися в кожній постановці. Негативний контроль повинен показувати відсутність специфічного фарбування, тоді як Позитивний Контроль повинен мати інтенсивність фарбування 2+ або вище. Якщо очікувані результати не отримані, постановка вважається недійсною і аналіз повинен бути повторений. Якщо неадекватні результати для контролів повторюються, то можливі наступні причини:

- Якщо спостерігаються сліди контамінації, такі як каламутність, такий контроль повинен бути викинутий і використаний інший контроль.
- Проблеми з оптичною системою або флуоресцентним мікроскопом. Це можуть бути: невідповідні настройки, використання ламп за межами очікуваних характеристик. і т.д.
- Висихання слайдів під час процедури аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ
Результати тестів на ендомізіальні антитіла повинні бути представлені як негативні (з титром менше 2.5), позитивні з титром більше ніж або рівним 20, або, переважно, позитивні з конкретним титром кінцевої точки.
Дивитись Фото 1 для специфічного фарбування ендомізіального шару пучків гладком'язових клітин. Ендомізіальні антитіла реагують як мережа тонких, нерегулярних ліній навколо сарколемми окремих волокон гладких м'язів. Це знаходиться в різкому контрасті з антитілами анти-гладких м'язів, які реагують з саркоплазмою. **Дивись Фото 2.**
Інші антитіла, що виявляються, крім анти-гладких м'язів (ASMA) включають антинуклеарні антитіла (ANA). Наявність ASMA як відомо, викликає хибні негативні результати для ендомізіальних антитіл. Якщо ASMA виявляються, то зразок повинен бути випробуваний при більш високих розведеннях[1]. ANA реакції на гладкі м'язові тканини, коли вони відбуваються, як правило, слабо і рідко поширюються і, отже, навряд чи можуть викликати помилкові негативні результати.

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ
В деяких випадках, сироватка, позитивна на EMA, може бути або дуже слабкою або негативною на початковому скринінговому розведенні (ефект прозони). В таких сумнівних випадках сироватка повинна бути аналізована при більш високих розведеннях і, якщо позитивна, титр антитіл визначається.
Наявність двох або більше антитіл в сироватці крові, які є реактивними з тією ж тканиною, може викликати втручання в їх виявлення за допомогою імунофлюоресценції. Це втручання може призвести або нездатності виявити EMA або зниження його титру, якщо інтерферуюче антитіло має більш високий титр, ніж EMA. Найбільш поширеною причиною явища інтерференції в тестах EMA є співіснування антитіл гладком'язових клітин. Рекомендується сироватки пацієнтів, які також містять ASMA, аналізувати додатково при більш високих розведеннях. ASMA класу IgA не є загально поширеним. ASMA класу IgG не блокують IgA-EMA, так як перші реагують з саркоплазмою гладких м'язів розшарування і останні реагують з ендомізієм сарколемми навколо пучків гладких м'язів. Антитіла анти-ретикуліну не заважають реакції EMA, тому що вони не вступають в реакцію з тканиною гладкого м'язу приматів.
У деяких пацієнтів з целіакією і дефіцитом IgA, ендомізіальні антитіла IgA-класу відсутні. Тим не менш, такі пацієнти, як правило, мають позитивний результат на EMA класу IgG.
Пацієнти з целіакію на безглютенової дієті для> 9 місяців незмінно негативні для EMA.
При постановці діагнозу, результати всіх лабораторних випробувань завжди повинні бути оцінені поряд із загальною клінічною історією хвороби пацієнта.

ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ
Як видно з таблиці 1, EMA, виявлений на гладких м'язах приматів, є дуже специфічними маркерами целіакії і герпетиформного дерматиту. Наявність EMA, здається, пов'язана з кишковою патологією як при целіакії так і при герпетиформному дерматиті, а не з ураженням шкіри в останньому, як показано на малюнку 1.

ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ
Тестовий набір ImmuGlo™ Анти-ендомізіальні антитіла (EMA) був порівняний з іншим комерційно доступним набором для виявлення EMA. Порівняння включало в цілому 68 сироваток: 20 пацієнтів з клінічною підозрою на целіакію і 48 нормальних контролів. Сироватки випробовались відповідно до процедури, рекомендованої виробником. Скринінгове розбавлення 2.5 було використано, і всі сироватки з позитивним результатом на EMA, були титровані до кінцевої точки. Результати були наступними:

		Immco™ EMA		
		POS (+)	**NEG (-)**	**TOT (=)**
	POS (+)	18	0	18
Other	**NEG (-)**	2	48	50
EMA IFA	**TOT (=)**	20	48	68

Відносна специфічність: 97%
Відносна чутливість: 100%
Відносна узгодженість: 96%

(Таблиці і малюнки див. в оригіналі інструкції).

ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

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

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»