



Инструкция по применению

Действителен по состоянию на
28.02.2023

ASMA IFA

REF 84048

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ
для определения антител IgG к гладкой
мускулатуре в человеческой сыворотке



ДжиЭй Джинерик Эссейс ГмБХ
Людвиг-Эрхард Ринг 3
15827 Бланкенфельде-Малов ОТ Далевиц
Германия

Телефон: +49 33708 9286 0
Факс: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



12 x 4



1 Назначение

ASMA IFA - это иммунофлуоресцентный анализ (ИРИФ) для качественного и полуколичественного определения антител IgG в сыворотке крови человека против гладкой мускулатуры на срезах ткани желудка крысы.

ASMA IFA применяется в качестве вспомогательного метода диагностики аутоиммунных заболеваний печени в сочетании с другими клиническими и лабораторными данными.

Иммуноанализ предназначен для ручной профессиональной диагностики *in vitro*.

2 Диагностическая значимость

Аутоиммунные заболевания вызваны нарушением клеточных и/или гуморальных иммунологических реакций. Эти реакции, которые обычно происходят против внешних воздействий, при определенных обстоятельствах могут обернуться против самого организма и тем самым вызвать различные заболевания.

Антитела к гладким мышцам (АГМА) встречаются при различных заболеваниях печени, например, при остром и хроническом гепатите, первичном билиарном циррозе и других формах цирроза печени. Кроме того, обнаружение АГМА способствует диагностике СКВ, инфекционного мононуклеоза, карциномы молочной железы и яичников, а также злокачественных меланом.

Присутствие АГМА в непрямым иммунофлуоресцентных анализах с использованием желудка крысы подтверждается флуоресцентным окрашиванием гладкомышечных волокон в мышечной оболочке слизистой оболочки или в мышечной оболочке желудка, а также флуоресценцией межжелудочных сократительных фибрилл слизистой оболочки желудка.

Мелкозернистая флуоресценция париетальных клеток слизистой оболочки желудка указывает на наличие антител

к антигенам париетальных клеток (РКА). Циркулирующие антитела против структур париетальных клеток слизистой оболочки желудка обычно обусловлены пернициозной анемией. Однако они могут быть обнаружены и при других заболеваниях желудка (хронический атрофический гастрит, язва желудка), заболеваниях щитовидной железы (тиреозит Хашимото, микседема), реже при гипохромической анемии и сахарном диабете, а также у пожилых пациентов.

3 Принцип анализа

ИРИФ (непрямой анализ иммунофлуоресценции) - это метод для определения специфических антител. Срезы тканей или клетки, содержащие интересующий антиген, иммобилизуются на предметных стеклах. Если в образце пациента присутствуют специфические антитела, они связываются с антигеном в ткани. ФИТЦ - меченые вторичные антитела, выявляют флуоресцентным окрашиванием, образовавшийся иммунный комплекс. Характер свечения оценивается с помощью флуоресцентного микроскопа. Тип свечения свидетельствует о наличии специфических антител в образце пациента.

4 Комплектность набора

Компонент	Описание
Предметные стекла A Ag 4 12 шт.	12 предметных стекол (готовых к применению), по 4 лунки на предметное стекло, каждая лунка покрыта криостатными срезами тканей желудка крысы
Отрицательный контроль N CONTROL - 1 x 2,0 мл	Разбавленная человеческая сыворотка (готов к применению; содержит азид натрия)
Положительный контроль P CONTROL + 1 x 2,0 мл	Разбавленная человеческая сыворотка (готов к применению; содержит азид натрия)
ФСБ буфер C BUF PBS 2 x 10 г	ФСБ буфер (сухое вещество для 2 x 1000 мл)
Конъюгат IgG D CONJ 1 x 5 мл	Поликлональные антитела anti-human IgG, конъюгированные с ФИТЦ (готово к применению; содержит азид натрия)
Среда для заливки E MOUNT 1 x 3,0 мл	Раствор ФСБ с глицерином и антиобесцвечивающим реагентом (готовый к применению; содержит азид натрия)
Шаблоны для стекла F TEMPL 12 шт.	Шаблоны из впитывающей бумаги
Покровные стекла G COVER 12 шт.	Покровные стекла
Сертификат анализа 1 шт.	-
Инструкция по применению 1 шт.	-

5 Необходимые дополнительные материалы

- Общее лабораторное оборудование
- Микропипетки (5 - 1000 мкл) и одноразовые наконечники
- Мерный цилиндр (100 - 1000 мл)

- Пробирки для приготовления разведений и штативы
- Рортексный миксер или другой ротатор
- Влажная камера
- Пластиковая бутылка для мытья
- Ванночка для окрашивания предметных стекол
- Флуоресцентный микроскоп с фильтром возбуждения на 490 нм и блокирующим фильтром: 520 нм
- Адсорбирующая бумага или бумажное полотенце
- Дистиллированная или деионизированная вода

6 Хранение и стабильность

После получения все компоненты теста должны храниться при температуре от 2 °C до 8 °C, предпочтительно в оригинальной коробке с набором. При надлежащем хранении в оригинальной упаковке все компоненты стабильны до истечения срока годности. После вскрытия все компоненты набора при надлежащем хранении остаются стабильными в течение не менее 2 месяцев.

7 Общая информация

Данный продукт предназначен только для диагностики *in vitro*. Перед использованием необходимо внимательно ознакомиться с инструкцией по применению. Она применяется только для данного продукта с указанным составом и должны строго соблюдаться для обеспечения достоверных результатов теста. Отступления могут привести к ошибочным результатам теста. Компоненты не должны заменяться тестовыми реактивами других партий или других производителей.

Необходимо избегать загрязнения реагентов, используя асептические методы при извлечении аликвот из флаконов. После использования флаконы с реагентами должны быть плотно закрыты соответствующими крышками.

Перекрестное загрязнение образцов или реагентов может привести к несовместимым результатам тестирования, и его следует избегать, используя последовательную технику пипетирования.

Необходимо избегать воздействия сильного света на реагенты в течение всей процедуры испытания и хранения.

Недостаточная промывка приведет к низкой точности и повышенным измерительным сигналам. После каждого этапа промывки остатки жидкости должны быть полностью удалены.

8 Подготовка к анализу

8.1 Подготовка реагентов

Перед использованием в течение не менее 30 минут все компоненты, включая предметные стекла, должны быть доведены до комнатной температуры (КТ: 18 °C - 25 °C). Все жидкие компоненты должны быть аккуратно перемешаны для обеспечения однородности.

8.1.1 Предметные стекла

Слайды индивидуально запечатаны с влагопоглотителем в алюминиевые пакеты. Осторожно вынимайте предметные стекла из пакетов непосредственно перед использованием.

8.1.2 Контроли

Положительные и отрицательные контроли готовы к использованию и не требуют разведения. Контроли должны применяться при каждой постановке теста. Лаборатории также могут валидировать свои собственные контрольные образцы и использовать их в качестве альтернативы.

8.1.3 Буфер ФСБ

Перед использованием буферную смесь ФСБ необходимо растворить в 1,0 л дистиллированной воды и хорошо смешать. Полученный промывочный раствор должен иметь pH 7,4 ± 0,2. Приготовленный ФСБ стабилен в течение 4 недели при хранении при температуре 2-8 °C и соблюдении правил использования.

Не используйте раствор, если ФСБ помутнел, образовался осадок или изменился pH.

8.1.4 Конъюгат

Конъюгат готов к применению. Следует избегать воздействия сильного света.

8.1.5 Среда для заливки

Среда для заливки готова к применению.

8.2 Подготовка образцов

8.2.1 Пробы пациента

Рекомендуется использовать свежесобранную сыворотку крови, взятую путем венопункции. Следует избегать использования иктеричных, липемических, гемолитических или бактериально зараженных образцов. Нерастворимые вещества должны быть удалены из образца путем центрифугирования. Образцы не должны подвергаться термической инактивации.

8.2.2 Разбавление пробы

Образцы должны быть разведены 1:20 (например, 10 мкл + 190 мкл) буфером ФСБ и тщательно перемешаны. Следует избегать образования пены.

Для титрования образцов рекомендуется приготовить 4-кратное серийное разведение на основе первоначального разведения 1:20 с буфером ФСБ, например, 100 мкл разведения образца + 300 мкл буфера ФСБ, в результате чего получаются разведения 1:80; 1:320, 1:1280 и т.д.

8.2.3 Хранение образцов

Образцы могут храниться при 2-8 °C в течение трех дней. Для длительного хранения требуется температура -20° C. Следует избегать повторного замораживания и оттаивания. Если образцы должны использоваться для нескольких анализов, разделите образцы на аликвоты и храните при температуре -20° C.

9 Производительность теста

9.1 Процедура

Необходимо подготовить достаточное количество предметных стекол. Не прикасайтесь к лункам и не допускайте высыхания предметных стекол с субстратом в течение всей процедуры тестирования. Необходимо соблюдать указанные время и температуру инкубации и избегать значительных временных сдвигов при пипетировании образцов и реагентов.

Шаг	Описание
1. Нанесение контролей и разбавленных проб	Нанесите по 50 мкл (2 - 3 капли) готовых к применению контролей и 50 мкл разбавленных образцов в каждую лунку. Убедитесь, что каждая лунка заполнена
2. Инкубация	Инкубируйте в течение 30 мин. при КТ во влажной камере
3. Промывка	Аспирируйте жидкость из каждой лунки и осторожно промойте промывочным раствором ФСБ с помощью бутылки для промывки. Не направляйте поток ФСБ непосредственно на лунки. Для предотвращения перекрестного загрязнения избегайте промывания одной лунки через другие лунки. Для 12-луночных предметных стекол проведите струю ФСБ от средней линии предметного стекла последовательно вдоль обоих рядов до края. Промойте 2 x 5 мин в меняющемся растворе ФСБ в промывочной ванночке, слегка встряхивая. Извлеките предметные стекла из промывки по одному, стряхнув лишний ФСБ -раствор и тщательно осушив вокруг внешних краев с помощью,

	прилагаемой впитывающей шаблон-бумаги.
4. Нанесение конъюгата	Добавьте 50 мкл (2 - 3 капли) готового к применению конъюгата в каждую лунку. Убедитесь, что каждая лунка полностью покрыта.
5. Инкубация	Инкубируйте в течение 30 мин. при КТ во влажной камере, защищенной от прямого света.
6. Промывка	Повторите весь цикл промывки, как описано в п. 3.
7. Нанесение среды для заливки	Нанесите по 1 капли в каждую лунку готовой к применению среды для заливки
8. Покрытие	Осторожно поместите одно покровное стекло на предметное стекло, чтобы среда для заливки образовала равномерный слой между покровным стеклом и предметным стеклом. Избегайте воздушных пузырьков. Сотрите излишки среды с краев и нижней части предметного стекла с помощью впитывающей бумаги.
9. Анализ	Проанализируйте слайд с помощью флуоресцентного микроскопа с длинами волн возбуждения 490 нм и эмиссии 520 нм в течение 24 часов. Избегайте более длительной экспозиции одного поля зрения, чтобы минимизировать обесцвечивание флуоресценции FITC.

9.2 Автоматизация

Автоматизированная обработка иммуноанализа должна быть выполнена аналогично ручному применению и валидирована пользователем.

10 Расчёт результатов

10.1 Метрологическая прослеживаемость

Иммуноанализ калибруется с использованием внутренних образцов в качестве эталонов.

10.2 Оценка

Оценка проводится по типу свечения и интенсивности флуоресценции. Интенсивность флуоресценции может быть полуколичественно определена в соответствии с рекомендациями CDC, Атланта, США:

4+ = максимальная флуоресценция, яркий желто-зеленый цвет

3+ = менее яркая желто-зеленая флуоресценция

2+ = определенная, но тусклая желто-зеленая флуоресценция

1+ = очень тусклая приглушенная флуоресценция

Степень интенсивности не имеет клинического значения и имеет лишь ограниченную ценность как показатель титра. Различия в оптике микроскопа, фильтрах и источнике света могут привести к различиям в интенсивности.

Разведение сыворотки считается отрицательным для АСМА, если интенсивность флуоресценции менее 1+ и в ткани отсутствует специфический флуоресцентный рисунок.

Разведение сыворотки считается положительным для АСМА, если интенсивность флуоресцентного окрашивания составляет 1+ или выше, а в срезах ткани четко различим рисунок флуоресценции.

На наличие АСМА указывает флуоресценция гладкомышечных волокон слизистой оболочки, мышечной оболочки желудка, а также флуоресценция межжелудочных сократительных фибрилл слизистой оболочки желудка.

Единственная мелкозернистая флуоресценция париетальных клеток слизистой оболочки желудка указывает на наличие антител к париетальным клеткам (РСА/ АПКЖ). Поскольку гетерофильные антитела могут вызывать аналогичную картину флуоресценции на желудке крысы, положительный результат на АПКЖ должен быть подтвержден другим тестом.

Если проводится полуколичественная оценка путем титрования, результат должен быть представлен как обратная величина последнего разведения, в котором обнаружена интенсивность флуоресценции 1+ яблочно-зеленого цвета с четко различимым рисунком окрашивания. Для определения конечного титра обычно используется титрование 2х шагом, можно экстраполировать титр конечной точки, пример:

1:20 = 3+

1:80 = 2+

1:320 = +/-

1:1280 = - Экстраполированный титр равен 160.

10.3 Критерии достоверности теста

Испытания действительны только при соблюдении следующих критериев действительности:

- Отрицательный контроль должен быть оценен как отрицательный с интенсивностью флуоресценции < 1+.
- Положительный контроль должен быть оценен положительно с окрашиванием и интенсивностью флуоресценции от 3+ до 4+.

Если эти критерии не соблюдены, тест недействителен и должен быть повторен.

10.4 Устранение неполадок

В случае достоверного теста следует проверить сроки годности и условия хранения, время и температуру инкубации, а также точную калибровку всех используемых приборов. Если причину недействительного теста установить не удалось, обратитесь к поставщику или производителю продукта. Руководство по устранению неполадок предоставляется по запросу.

10.5 Референсные значения

Референсные диапазоны указаны ниже:

	Интерпретация
Титр антител < 1:20	отрицательный
Титр антител ≥ 1:20	положительный

В связи с различными показателями встречаемости заболевания в отдельных регионах, каждая лаборатория должна проверить диапазон предельных значений с помощью собственных анализов и при необходимости скорректировать его.

10.6 Интерпретация результатов тестирования

Положительный результат теста указывает на наличие специфических антител. Отрицательный результат указывает на отсутствие специфических антител, но не исключает возможность аутоиммунной реакции. В случае пограничного результата теста достоверная оценка невозможна.

Слабое флуоресцентное окрашивание при титрах 1:20 - 1:40 или неясность клинической картины должны быть подтверждены в ходе диагностического мониторинга через 3 - 4 недели.

10.7 Ограничения метода

Обнаружение антител в значительной степени зависит от используемого участка ткани.

Определение титра конечной точки может варьироваться в зависимости от типа и состояния используемого флуоресцентного микроскопа, а также в зависимости от субъективной оценки различных наблюдателей.

Образцы и промывочные растворы, загрязненные бактериями или грибами, могут вызвать неспецифическое окрашивание субстрата клеточной культуры.

Протеолитические ферменты в образцах пациентов могут привести к повреждению или потере участков ткани, зафиксированных на предметном стекле.

Интерпретация результатов анализов всегда должна рассматриваться в сочетании с клинической картиной пациента. Диагноз не должен основываться на результатах единственного метода диагностики. Для постановки диагноза необходимо оценить

все клинические и лабораторные данные. Для подтверждения необходимо провести дополнительные исследования.

11 Эксплуатационные характеристики

11.1 Аналитические характеристики

11.1.1 Аналитическая чувствительность и специфичность

Перекрестной реактивности антител против аналогичных антигенов не наблюдалось.

11.1.2 Точность

Точность результатов теста оценивалась путем определения внутри- и межаналитической вариабельности при анализе нескольких образцов с различной активностью антител. Различий в качественной оценке не обнаружено.

11.2 Диагностические характеристики

11.2.1 Диагностическая чувствительность и специфичность

Чувствительность и специфичность были оценены путем анализа образцов от пациентов с аутоиммунным гепатитом и неизбранных доноров крови.

	Значение параметра
Чувствительность	> 90 %
Специфичность	> 90 %

12 Предупреждения и меры предосторожности

Продукт предназначен исключительно для использования в диагностике *in vitro* квалифицированным, уполномоченным и обученным персоналом. Со всеми компонентами теста и образцами следует обращаться осторожно как с потенциально опасными. Следует придерживаться надлежащей лабораторной практики (GLP) и всех соответствующих нормативных актов.

В случае повреждения изделия или неправильной или неточной информации о продукте, включая маркировку, пожалуйста, свяжитесь с производителем или поставщиком.

Данный продукт содержит препараты человеческого и/или животного происхождения. Любой материал, полученный из жидкостей тела или органов, использованных для приготовления компонентов, был протестирован и признан отрицательным на HBsAg (антиген вируса гепатита В) и анти-ВИЧ, а также анти-ВГС антитела. Тем не менее, со всеми компонентами и всеми образцами пациентов следует обращаться как с потенциально опасными в соответствии с национальным законодательством и соответствующими руководствами по биологической безопасности.

Поскольку продукт содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности: Не курите, не ешьте и не пейте во время работы с материалом набора или образцами. Избегайте прямого контакта с материалом набора или образцами, надев защитные перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не пипетируйте материал через рот. Быстро вытирайте разливы и тщательно мойте пораженную поверхность дезинфицирующим средством. Тщательно мойте руки после использования.

Некоторые реагенты содержат азид натрия (< 0,1 %) в качестве консерванта, их нельзя глотать, или допускать контакта с кожей или слизистой. Возможное образование азидов тяжелых металлов в дренаже должно быть предотвращено путем достаточного промывания водой.

Необходимо соблюдать содержащуюся в паспорте безопасности информацию о возможных опасностях, мерах первой помощи, мерах в случае непреднамеренного выброса больших количеств, обращении и хранении, средствах индивидуальной защиты, информацию об утилизации, а также информацию о токсикологии.

О любом серьезном инциденте, произошедшем в связи с устройством, необходимо сообщить производителю и компетентному органу государства-члена, в котором находится пользователь и/или пациент.

13 Утилизация

Для дезактивации и утилизации следует придерживаться рекомендаций МЗ, а также соответствующих местных и

национальных экологических инструкций и правил. Образцы, потенциально загрязненные материалы и инфекционные отходы должны быть обеззаражены, например, автоклавированием в течение 20 мин. при 121 °C.

14 Ссылки

- Humbel RL: Autoanticorps et Maladies Auto-Immunes, Elsevier 2nd edition, 1997.

- Jones DE: Autoantigens in primary biliary cirrhosis. J. Clin. Pathol. 2000, 53, 813 – 21.

- Lyerla HC, Forrester FT: The Immunofluorescence (IF) test. In: Immunofluorescence methods in virology, USDHHS, Georgia, 1979, 71 – 81.

- Silvestrini RA, Benson EM: Whither smooth muscle antibodies in the third millennium? J. Clin. Pathol. 2001, 54, 677 – 8.

- Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN: Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. J. Autoimmune Dis. 2004, 1, 2.

15 Символы

	Производитель
	Маркировка соответствия CE
	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>
	Номер по каталогу
	Уникальный идентификатор устройства
	Код партии
	Температурный диапазон
	Срок годности
	Ознакомьтесь с инструкцией по применению
	Содержит достаточно для <n> тестов
	Не используйте повторно
	Осторожно!
	Биологический риск
	Беречь от солнечного света
	Предметные стекла с х лунками
	Отрицательный контроль
	Положительный контроль
	Конъюгат
	ФСБ буфер
	Среда для заливки
	Шаблоны для стекла
	Покровные стекла

16 Изменения

Изменения в действующих инструкциях по применению	
Текущая версия	008/02.2023
Резюме изменений	Редакционные изменения и адаптация стабильности ФСБ-буфера при использовании.