



Набор ИФА для определения ТИРЕОИДНОГО МИКРОСОМАЛЬНОГО АНТИГЕНА

Каталог. № : 1422Z
Количество : 96
Производитель : DAI (США)

Методика от 10-10-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Анализ	Thyroid Microsomal ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный: положительный, отрицательный и пороговый (cut-off)
Образец	10 мкл
Специфичность	97,7 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для определения и полуколичественного вычисления антител к микросомам в сыворотке человека. Анализ используется для определения антител в одном образце сыворотки. Результаты используются в целях диагностики тиреоидных аутоиммунных заболеваний. **Только для диагностического использования in vitro. Анализ высокой сложности.**

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест является ферментно-связанным иммунсорбентным анализом для определения IgG, IgM и IgA антител к микросомальным антигенам. Очищенные микросомальные антигены добавлены к твердой фазе микролунок анализа. Разбавленная сыворотка теста добавляется в каждую лунку. Если присутствуют антитела, которые распознают антиген, формируется комплекс антиген – антитело. После инкубации лунки промываются для удаления несвязанного антитела. Ферментом меченные анти-человеческие IgG, IgM и IgA добавляются в каждую лунку. Если присутствует антитело, конъюгат связывается к антиген-антитело комплексу. После инкубации лунки промываются для удаления несвязанного конъюгата. Добавляется в каждую лунку субстрат раствор. Если присутствует фермент, субстрат изменяет окрас. После периода инкубации, реакция останавливается и измеряется интенсивность окраса, что приводит к непрямо измерению специфического антитела в образце пациента.

СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Поставляемые материалы

Каждый набор содержит точное количество компонентов, необходимое для числа анализов, указанное на этикетке упаковки.

- Микросомальный антиген**, привитый к микропланшету: 96 лунок, разделен на 12 1x8 стрипов, что храниться в фольговом пакете с осушителем. – **96Т: 1 планшет.**
- Разбавитель сыворотки тип III:** готовый к использованию. Содержит буфер, BSA, Tween-20 и проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут. 30 мл.**
- Высоко положительный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на наборе. Высоко положительный контроль применяется для контроля верхнего динамического диапазона анализа. – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**
- Калибратор:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, со специфическим фактором набора, указанным на наборе. Калибратор величины исключения используется для калибровки анализа для вычисления ежедневного колебания температуры. Ресурсный материал для калибратора величины исключения отличается от контролей – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.**

- Отрицательный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на этикетке – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.***
- Низко положительный контроль:** человеческая сыворотка или дефибринированная плазма. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на наборе. Низко положительный контроль применяется для контроля диапазона анализа, близкого к пороговому. – **96Т: 1 фл., 0,4 мл.***
- Конъюгат пероксидазы хрена:** готовый к использованию. Козлиный анти-человеческий IgG, A и M, содержащий проклин (0,1%) и гентамицин в качестве консерванта. - **96Т: 1 бут., 15 мл.**
- Промывочный буфер тип II (20X концентрат):** разбавьте 1 часть концентрата + 19 частей деионизированной или дистиллированной воды. Содержит TBS, Tween-80 и проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут., 50 мл.**
- Раствор хромогена/субстрата тип I:** TMB, готовый к использованию. Реагент должен отставаться закрытым когда он не используется. При испарении в лунках для реагентов может образоваться осадок. – **96Т: 1 бут., 15 мл.**
- Стоп-раствор:** готовый к использованию, содержит раствор 1N H₂SO₄ – **96Т: 2 бут., 15 мл.**

*Примечание: флаконы с сывороткой могут содержать лишний объем.

Следующие компоненты не зависят от номера партии набора и могут использоваться взаимозаменяемо с аутоиммунными наборами ИФА «Тринити Биотех»: разбавитель сыворотки тип III, раствор хромогена/субстрата тип I, промывочный буфер тип II и стоп раствор. Пожалуйста, проверяйте использование соответствующего типа реагента ДАИ для анализа (тип I, тип II, и т.д.).

Дополнительные требования

- Бутылка для промывания или полу-автоматическое устройство для промывания.
- Микропипетки, включая многоканальные, способные точно распределять объемы 10-200 мкл (КВ меньше чем 3%).
- Мерная колба (1 л).
- Бумажные полотенца.
- Тестовые пробирки для разбавления сыворотки.
- Резервуары реагента для многоканальных пипеток.
- Наконечники для пипеток.
- Деионизированная или дистиллированная вода (dH2O), CAP тип I или аналог.
- Таймер 0-60 минут с точностью +/- 1 секунда.
- Резервуар для уничтожения и дезинфекции (напр. 0,5% гипохлорид натрия) (50 мл отбеливателя в 950 мл dH 2O)..
- Микропланшетный ридер с одной или двойной длиной волны при фильтре 450 нм. Если используется двойная длина волны, установите фильтр 600-650 нм. Установите линейную спецификацию ридера согласно руководству по эксплуатации.

Примечание: используйте только чистую, сухую стеклянную посуду.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- Хранить не вскрытый набор при 2-8°C. Набор анализа может использоваться до окончания срока годности, указанного на этикетке набора.
- Не вскрытый микропланшет необходимо хранить при 2-8°C. Неиспользованные стрипы необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и индикатор влаги и хранить при 2-8°C.
- Хранить раствор HRP конъюгата при 2-8°C.
- Хранить калибратор, высоко положительный, низко положительный и отрицательный контроли при 2-8°C.
- Хранить разбавитель сыворотки тип III и 20X промывочный буфер тип II при 2-8°C.
- Хранить раствор хромогена / субстрата тип I при 2-8°C.
- Хранить 1X (разбавленный) промывочный буфер тип II при комнатной температуре (21-25°C) 5 дней или 1 неделю при 2-8°C.

Примечание: Если сохранить температуру хранения стабильной, реагенты и субстрат будет стабильный до окончания срока пригодности. Смотрите дату, указанную на этикетке набора. При изготовлении придерживались необходимых мер предосторожности для защиты реагентов от загрязнения и от бактериологических агентов. Защищайте реагенты этого набора от загрязнения.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для диагностического использования *in vitro*.
2. Обращайтесь со всеми реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
3. Компоненты этого набора тестировались на контроль качества соответственно серии набора. Не смешивайте компоненты разных серий, кроме раствора хромоген / субстрата, стоп раствора и промывочного буфера. Разбавитель образцов типа I может использоваться с другими IgG наборами. Не смешивайте компоненты разных изготовителей.
4. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности.
5. Все реагенты необходимо привести к комнатной температуре (21-25⁰) до начала теста. Забирайте только необходимый объем реагентов. Не вливайте реагенты обратно во флакон, поскольку может происходить загрязнение.
6. Перед вскрытием флаконов калибратора и контроля, постучите по крышке, что б вся жидкость была на дне флакона.
7. Используйте только дистиллированную или деионизированную воду и чистую посуду.
8. Не давайте возможности ячейкам высохнуть; добавляйте реагенты немедленно после окончания шага промывания.
9. Избегайте перекрестного загрязнения реагентов. Мойте руки до и после работы с реагентами.
10. При ручном промывания лунки необходимо промывать три раза. При автоматическом промывании необходимо промывать пять раз.
11. Азид натрия подавляет активность конъюгата. Необходимы чистые наконечники для добавления конъюгата, что б азид натрия не попадал от других реагентов.
12. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью и формировать взрывоопасные вещества. При попадании, промойте большим количеством воды.
13. Не пипетируйте ртом и избегайте попадания реагентов и сыворотки пациента на кожу.
14. Если используется раствор гипохлорида (отбеливатель) в качестве дезинфицирующего вещества, избегайте попадания на рабочую поверхность, поскольку, существует возможность влияния на активность фермента.
15. Избегайте контакта стоп раствора с кожей и глазами. В случае попадания, промойте большим количеством воды.
16. **Внимание:** жидкие отходы при кислоте pH необходимо нейтрализовать до добавления их в раствор гипохлорида (отбеливатель) для избегания формирования ядовитых газов.
17. Не используйте раствор хромогена/субстрата если он начал становиться синим.
18. Концентрации тиреоглобулина в образцах, что определена в разных анализах разных производителей может варьировать через разницу в методах и специфичности реагента.

ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Обращайтесь с кровью и сывороткой как с потенциально инфицированными.
2. Оптимальное проведение данного теста зависит от использования свежих образцов сыворотки (чистой, не гемолизированной, не липемической, не иктерической). Минимальный объем сыворотки рекомендуется 50 мкл, поскольку необходимо повторение теста. Образцы следует собирать асептической венопункцией. Быстрое отделение от ступков минимизирует гемолиз сыворотки.
3. Хранить сыворотку при 2-8⁰C если тестирование будет проводиться в течении двух дней. Если образцы будут храниться дольше, храните при -20⁰C или ниже. Не используйте саморазмораживающую систему. Образцы, что хранились не должным образом или подверглись многочисленным циклам замораживания / размораживания, могут давать ошибочные результаты.
4. Сыворотка, содержащая видимые частицы вещества может поддаться вращению путем центрифугирования на нижней скорости.
5. Не используйте сыворотки инaktivированные теплом.
6. NCCLS дает рекомендации относительно хранения образцов.

МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ**Подготовка к анализу**

1. Все реагенты следует вынуть из холодильника и привести к комнатной температуре перед использованием (21-28⁰C). Поместите все реагенты в холодильник после использования.
2. Все образцы и контроли следует перемешать перед использованием.
3. Разбавьте 50 мл 20X промывочного буфера тип II дистиллированной или /и деионизированной водой до 1 л. Хорошо перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Вставьте необходимое количество стрипов в рамку для микропланшета. Используйте 6 определений контролей/калибраторов (один отрицательный контроль, три калибратора, один высоко положительный контроль и один низко положительный контроль) в одной процедуре. Бланк реагент (БР) необходимо использовать в каждом анализе. Проверьте требования ПО и ридера для правильной конфигурации контроля/калибратора. Поместите неиспользованные стрипы в запечатанный пакет с осушителем, запечатайте и немедленно поместите в холодное место.

Пример конфигурации:

1A	RB	2A	Пациент 2
1B	NC	2B	Пациент 3
1C	Cal	2C	Пациент 4
1D	Cal	2D	Пациент 5
1E	Cal	2E	Пациент 6
1F	HPC	2F	Пациент 7
1G	LPC	2G	Пациент 8
1H	Пациент 1	2H	Пациент 9

RB – бланк реагент – ячейка без сыворотки со всеми реагентами.

Используется для контрольной проверки ридера .

NC – Отрицательный контроль

Cal – калибратор

HPC –высоко положительный контроль

LPC –низко положительный контроль

2. Разбавьте разбавителем сыворотки исследуемые сыворотки, калибратор и контрольные сыворотки 1:21 (напр., 10 мкл + 200 мкл). Тщательно перемешайте. (При ручном разбавлении предлагается вносить сначала разбавитель сыворотки в тестовую пробирку, а потом добавить сыворотку пациента.)
3. В отдельные лунки внести 100 мкл должным образом разбавленного калибратора, контролей и сывороток пациентов. Добавить 100 мкл разбавителя сыворотки в лунку бланк-реагента. Проверьте требования к ПО и ридера для конфигурации лунки бланк реагента.
4. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25⁰C) **30 минут +/- 1 минута**.
5. Аспирировать или вытряхнуть жидкость с лунок. При использовании полуавтоматического или автоматического устройства для промывания, добавьте 250-300 мкл разбавленного моющего буфера. Аспирируйте или вытряхните и переверните планшет вверх дном на бумажное полотенце для удаления всей жидкости. Повторите процедуру промывания 2 раза (для общего числа промывания 3) для ручного или полу автоматического промывания или четыре раза (для общего числа 5 промываний) для автоматического промывания. После окончательного промывания, промокните планшет на бумажное полотенце для удаления всей жидкости из лунок.

****Важное примечание:** Относительно этапов 5-8 – недостаточное или излишнее промывание влияет на результаты анализа. Поэтому, рекомендуется использовать полуавтоматическое или автоматическое промывание для полного заполнения каждой лунки (250-300 мкл). Всего необходимо пять промываний при автоматической процедуре. **Полностью удаляйте моющий буфер после последнего промывания, поскольку, это имеет крайне важное значение для точности выполнения анализа. Также визуально удостоверьтесь, чтобы не было пузырей в лунках.**

6. Добавьте по 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку бланк реагента. Избегайте пузырей при добавлении, так как они могут провоцировать ошибочные результаты.
7. Инкубируйте каждую лунку при комнатной температуре (21-25⁰C) **30±1 минуту**.
8. Повторите промывание как описано в п. 5.
9. Добавьте по 100 мкл раствора хромогена / субстрата в каждую лунку, включая лунку бланк реагента, соблюдайте одинаковый порядок добавления в лунки планшета.
10. Инкубируйте при комнатной температуре (21-25⁰C) **15±1 минуту**.
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора, придерживаясь того же порядка, что и при добавлении хромогена / субстрата, включая лунку бланк реагента. Легко постучите по внешней стороне планшета для смешивания всех компонентов лунок. Считать можно на протяжении одного часа после добавления стоп раствора.
12. Окрас, что развился, необходимо считать ELISA планшетным ридером при 450 нм. Если используется двойная волна,

установите фильтр при 600-650 нм. Прибор необходимо настроить относительно воздуха. Реагент бланка должен быть меньше, чем 0,150 абсорбции при 450 нм. Если реагент бланка $\geq 0,150$, тест необходимо повторить. Настройте ридер согласно реагенту бланка и продолжайте считывать всю лунку. Уничтожьте использованный планшет после считывания.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Калибратор и контроли должны использоваться при каждом тесте.
2. Бланка реагент должен быть $\leq 0,15$ ОП при 450 нм.
3. Средняя ОП для калибратора должна быть $\geq 0,300$ при 450 нм.
4. Коэффициентные значения для высоко положительного, низко положительного и отрицательного контролей должны быть в своих соответствующих границах, указанных на флаконах. Если значения контролей не соответствуют диапазону, тест необходимо повторить.
5. Если данные критерии не выполняются при повторении теста, обратитесь к производителю.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

1. Средняя ОП калибратора – вычислите среднее значение из трех определений калибратора. Если любое из трех значений калибратора отличается более чем на 15 % от среднего, отбросьте это значение и вычислите среднее двух оставшихся.
2. Коэффициент коррекции – для вычисления ежедневного колебания активности анализа согласно комнатной температуре и времени, коэффициент коррекции вычисляется для каждой серии набора. Коэффициент коррекции напечатан на флаконе калибратора величины исключения.
3. Значение порогового калибратора – значение порогового калибратора для каждого анализа определяется умножением коэффициента коррекции на среднее значение калибратора, полученное в этапе 1.
4. Значение коэффициента – вычислите значение коэффициента каждого образца делением значения ОП образца на значение ОП порогового калибратора, полученное в этапе 3.

Пример: ОП калибратора = 0,38, 0,42, 0,40
 Средняя ОП для калибратора = 0,40
 Коэффициент коррекции = 0,50
 Значение порогового калибратора = $0,50 \times 0,40 = 0,20$
 ОП сывороток пациентов = 0,60
 Коэффициент иммунного статуса = $0,60 / 0,20 = 3,00$

Анализ

1. Значения коэффициента пациентов интерпретируется следующим образом:

Значение коэффициента	Результаты	Интерпретация
$\leq 0,90$	Отрицательный	Определяемый уровень антитела к микросомальному антигену отсутствует.
0,91-1,09	Сомнительный	Образцы должны повторно анализироваться. См. п. 2 ниже.
$\geq 1,10$	Положительный	Указывает на присутствие определяемого уровня антител к микросомальному антигену.

2. Образцы при сомнительном результате следует повторно анализировать альтернативным методом или анализируйте новый образец.

КОНВЕРСИЯ В МЕЖДУНАРОДНЫЕ ЕДИНИЦЫ

Реактивность в международных единицах (МЕ) определяется согласно стандарту МЕ. Преобразование значений коэффициента в международные единицы проводится при использовании анализа регрессии. Каждая партия набора стандартизирован против международных единиц и поставляется со специфическим для партии таблицей преобразования (Преобразование международных единиц (МЕ) в мл для микросомальных антител IgG, A, M).
 Например:

Коэффициент	МЕ	Коэффициент	МЕ
0,5	5,14	3,5	92,79
1,0	8,33	4,0	150,29
1,5	13,49	4,5	243,40
2,0	21,84	5,0	394,20
2,5	35,38	5,5	638,43
3,0	57,30		

ПРИМЕЧАНИЕ: действительная таблица преобразования определенных МЕ поставляется с набором.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

1. Тиреоглобулин и/или микросомальные антитела присутствуют в большинстве пациентов с зобным тиреодитом (заболевание Хашимото), атрофическим тиреодитом и около 70-90% с болезнью Грейвса.
2. Антитела также обнаружены в половине пациентов с первичным гипотиреозом и тиротоксикозом и в 10-20% пациентов с простым зобом и тиреоидной опухолью.
3. Тиреоидные антитела присутствуют в 6-7% нормы и эти случаи растут с возрастом.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

1. Результаты не должны интерпретироваться как диагностические. Результаты должны использоваться в целях диагноза. Результаты должны интерпретироваться согласно клинической картине пациента в целом.
2. Сыворотка пациентов при других аутоиммунных заболеваниях и нормальных индивидов может содержать аутоантитела.
3. Необходимо использовать только образцы сыворотки. Образцы сыворотки сильно липемические, гемолизированные или мутные не должны использоваться в этом тесте.
4. Значение индекса $\geq 10,00$ должно подаваться как выше 10.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность и специфичность

DAI Microsomal ELISA набор оценился относительно коммерческого ELISA набора. В таблице 1 суммированы все данные.

Таблица 1
Чувствительность и специфичность набора
DAI Microsomal ELISA

Альтернативный набор ИФА	Набор DAI Microsomal ELISA			
	Полож. $\geq 1,10$	Сомнит. 0,91-1,09	Отриц. $\leq 0,90$	Всего
Полож. $\geq 0,60$	22	0	0	22
Отриц. $< 0,60$	2	3	86	91
Всего	24	3	86	113

Сыворотки при сомнительном диапазоне были исключены из следующего вычисления:

Относительная чувствительность = $22/22 = 100\%$

Относительная специфичность = $84/86 = 97,7\%$

Относительное согласование = $109/111 = 98,2\%$

Точность

Точность этого анализа была определена путем испытания семи разных сывороток восемь раз каждую в три разные дни. Данные этого исследования представлены в таблице 2. При надлежащей технике пользователь должен получить КВ меньше, чем 15%.

Таблица 2. Данные точности

Анализ 1 (n=8)			
Сыворотка	X	СО	КВ, %
1	5,93	,423	7,13
2	6,32	,537	8,50
3	5,92	,371	6,27
4	3,51	,134	3,82
5	5,86	,241	4,11
6	,093	,078	83,9
7	,061	,038	62,3

Анализ 2 (n=8)			
Сыворотка	X	СО	КВ, %
1	6,39	,528	8,26
2	6,94	,485	6,99
3	6,44	,421	6,54
4	3,80	,185	4,87
5	5,95	,335	5,63
6	,190	,109	57,4
7	,084	,042	50,5

Анализ 3 (n=8)			
Сыворотка	X	СО	КВ, %
1	6,08	,624	10,3
2	6,72	,333	4,96
3	6,28	,387	6,16
4	3,63	,296	8,15
5	5,75	,448	7,79
6	,163	,084	51,5
7	,145	,135	93,1

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

Сыворотка	X	CO	KB, %
1	6,14	,544	8,86
2	6,66	,511	7,67
3	6,22	,436	7,01
4	3,65	,240	6,58
5	5,85	,346	5,91
6	,148	,097	65,5
7	,099	,089	89,9

X – среднее микросомальное значение

CO – стандартное отклонение

KB – коэффициент вариации

Линейность

Коэффициентные значения набора DAI Microsomal были определены в серии двукратных разбавлений 5 положительных сывороток. Коэффициентные значения сравнивались с \log_2 разбавлением путем стандартной линейной регрессии. Данные таблицы 3 указывают, что анализ является полуколичественным.

Таблица 3. Линейность

Сыворотка	Чистый	1:2	1:4	1:8
1	7,00	5,50	3,83	2,33
2	7,88	6,92	5,42	4,04
3	7,17	5,67	4,08	2,58
4	4,42	3,13	2,08	1,08
5	3,25	2,00	1,08	0,58
1:16	1:32	1:64	1:128	r^2
1,54	0,71			,978
2,92	1,75	1,00		,994
1,75	0,92			,981
0,79				,963
				,966

r^2 – коэффициент определения.

КОНВЕРСИЯ МЕЖДУНАРОДНЫХ ЕДИНИЦ

Данные в таблице 4 показывают значение индекса микросомов для серийного разбавления международного стандарта. Значение индекса микросомов (Y) сравнивалось с международными единицами разбавления сыворотки линейной регрессии (показательный (экспоненциальный) анализ регрессии). Данные указывают, что международные единицы могут определяться из значения индекса.

Таблица 4. Конверсия международных единиц

Стандарта международных единиц Е/мл	Коэффициентные значения
500	5,25
250	4,54
125	3,85
62,5	3,09
31	2,34
15	1,65
7,8	0,94

Линейная регрессия сравнивает значение индекса против международных единиц

$r^2=0,99$ $a=1,037$ $b=1,198$ $Y=$ коэффициент $X=$ неизвестн. значение

Уравнение вычисления экспоненциальной регрессии:

= выведенная МЕ/мл $X = (Y + b)^x e$

A

ПРИМЕЧАНИЕ: действительная таблица преобразования определенных МЕ поставляется с набором.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Сыворотки, содержащие высокий уровень антител к потенциально реактивным антигенам были исследованы набором DAI Microsomal ELISA. Данные в таблице 5 (смотрите оригинал инструкции) указывают, что антитела к альтернативным аутоиммунным антигенам не имеют перекрестной реактивности с набором DAI Microsomal ELISA. (См. в оригинале инструкции).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).