



## Набор для определения АНТИТЕЛ К МИКРОСОМАЛЬНЫМ АНТИГЕНАМ

Microsomal IgG, A, M ELISA

**Кат. №** : 101-1422-1  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DAI (USA)

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

Методика от 04-05-2006

### 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 тироидных аутоиммунных заболеваний. Только для диагностики *in vitro*.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

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

### РЕАГЕНТЫ И ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Планшетка** с привитым микросомальным антигеном: 96 ячеек, поставляется с держателем стрипов и хранится в фольговом пакете с осушителем и картой индикатора влажности.
- Моющий буфер** (20х концентрат): 1 бут., 50 мл. Содержит буфер и твин 80.
- Разбавитель образца:** 1 бут., 30 мл. Содержит буфер, BSA и твин 80.
- Конъюгат:** 1 бут., 15 мл. Содержит пероксидазой хрена, конъюгированные анти-человеческие IgG, IgM и IgA в буфере.
- Субстрат:** 1бут., 15 мл. Содержит ТМВ.

- Стоп раствор:** 1 бут., 15 мл. Содержит раствор  $H_2SO_4$ .
- Высоко положительный контроль:** 1 фл., 0,4 мл. Содержит антитела, что сильно реактивные с антигеном. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Отрицательный контроль:** 1 фл., 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, что не реактивные к антигену. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Низко положительный контроль:** 1 фл., 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, что слабо реактивные с антигеном. Установленный диапазон указан на флаконе.
- Калибратор:** 1 фл., 0,4 мл. Содержит человеческую сыворотку с антителами, что реактивные с антигеном, используется для калибровки анализа. Специфический для набора фактор коррекции указан на флаконе.

### ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

- Все компоненты набора при хранении их при необходимых условиях стабильны до окончания срока пригодности. Не используйте после окончания срока пригодности.
- Невыскранный микропланшет необходимо хранить при 2-8<sup>0</sup>С. Неиспользованные стрипы необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и индикатор влаги и хранить при 2-8<sup>0</sup>С.
- все другие реагенты необходимо хранить при 2-8<sup>0</sup>С в их упаковке.
- Храните 1X (разбавленный) моющий буфер при комнатной температуре (21-25<sup>0</sup>С) до 5 дней или 1 неделю при 2-8<sup>0</sup>С.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

- Обращайтесь с реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
- Некоторые реагенты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид может реагировать со свинцом и медью и формировать взрывоопасные вещества. При попадании, промойте большим количеством воды.
- Только для ДИАГНОСТИКИ IN VITRO.
- Реагенты содержат консерванты, которые могут быть токсичными.
- Не пипетируйте ртом. Избегайте контакта реагентов и образцов пациентов с кожей и слизистыми.
- Избегайте контакта со стоп раствором. При попадании на кожу, промойте водой.
- Не допускайте пролива реагентов и образования аэрозолей.
- Не используйте инактивированную теплотой сыворотку.
- Не смешивайте компоненты разных лотов и изготовителей.
- Не разбавляйте и не подмешивайте реагенты.
- Не допускайте перекрестного загрязнения реагентов и образцов.
- Не используйте ТМВ субстрат раствор, если он принимает синий окрас.
- Множественно используемая посуда должна тщательно промываться от остатков.
- Не изменяйте температуру реагентов и инкубации выше или ниже комнатной температуры (21-25<sup>0</sup>С).

- Промывание очень важно. Недостаточно промытые ячейки дадут неверные результаты. Не допускайте высушивание ячеек между инкубацией.

### СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Образцы следует собрать асептической венепункцией и приготовить сыворотку, используя приемлемую технику.
2. Сыворотка, содержащая видимые частицы, может центрифугироваться при низкой скорости.
3. Сыворотка может храниться до 5 дней при 2-8<sup>0</sup>С. Если анализ будет проводится позже, храните образцы замороженные при -20-70<sup>0</sup>С. Избегайте многократных циклов замораживания / размораживания.
4. Не используйте гемолизированную, липемическую или загрязненную бактериями сыворотку.
5. Не нагревайте инактивированную сыворотку.

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Бутылка для промывания, полуавтоматическое или автоматическое устройство для промывания.
2. Микропипетки, включая многоканальные, способностью точного распределения объема 10-200 мкл (КВ меньше чем 3%).
3. Градуированный цилиндр (1 л).
4. Бумажное полотенце.
5. Тестовые пробирки для разбавления сыворотки.
6. Резервуар реагента для многоканальных пипеток.
7. Наконечники для пипеток.
8. Неионизированная или дистиллированная вода (dH<sub>2</sub>O) CAP тип 1 или эквивалент.
9. Таймер с точностью измерения +/- 1 секунда.
10. Резервуар для уничтожения и дезинфекции и 0,5% гипохлорид натрия (50 мл отбеливателя в 950 мл H<sub>2</sub>O)..
11. Инкубационный 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.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ

1. Все реагенты следует вынуть из рефрижератора и привести к комнатной температуре перед использованием (21-25<sup>0</sup>С). Поместите все реагенты в рефрижератор после использования.
2. Все образцы и контроли следует перемешать перед использованием.
3. Разбавьте 50 мл 20X моющего буфера тип I к 1 л дистиллированной или /и неионизированной водой. Перемешайте хорошо.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Определите число пациентов, что будут анализироваться. Для каждого анализа калибратор должен анализироваться в дубликате. А также отрицательный контроль, высоко положительный и низко положительный контроль, реагент бланка (RB) необходимо использовать в каждом анализе. Проверьте требования обеспечения и ридера для правильной конфигурации для контролей /калибратора.

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

2. Разбавьте тестовую сыворотку, калибратор, контроль 1:21 (напр., 10 мкл + 200 мкл) в разбавителе сыворотки. Тщательно перемешайте.
3. В отдельные ячейки внести 100 мкл соответствующих разбавленных контролей, калибратора величины исключения и сыворотку пациента. Добавить 100 мкл разбавителя сыворотки в ячейку для бланка. Проверьте требования обеспечения и ридера для конфигурации ячейки реагента бланка.
4. Инкубировать каждую ячейку при комнатной температуре (21-25<sup>0</sup>С) **30 минут +/- 1 минута.**
5. Аспирировать или вытряхнуть жидкость с ячеек. 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 ячеек.

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

6. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка. Избегайте пузырей при добавлении, так как они могут провоцировать ложные результаты.
7. Инкубируйте каждую ячейку 30±1 минута при комнатной температуре (21-25<sup>0</sup>С).
8. Повторите промывание как описано в шаге 5.
9. Добавьте 100 мкл раствора хромоген / субстрата в каждую ячейку, включая ячейку реагента бланка, соблюдайте одинаковый порядок добавления в ячейки планшета.
10. Инкубируйте 15±2 минуты при комнатной температуре (21-25<sup>0</sup>С).
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора, придерживаясь того же порядка, что и при добавлении хромоген / субстрата, включая ячейку реагента бланка. Легко постучите по внешней стороне планшета для смешивания всех компонентов ячеек. Подождите минимум 5 минут и

считайте. Считывать можно на протяжении одного часа после добавления стоп раствора.

- 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 ячейку. Уничтожьте использованный планшет после считывания.

### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Среднее значение калибратора – вычислите среднее значение для калибраторов для трех определений.
- Фактор коррекции – для вычисления между дневного колебания активности анализа согласно комнатной температуре и времени, фактор коррекции вычисляется для каждой серии набора. Фактор коррекции напечатан на флаконе калибратора величины исключения.
- Значение ОП величины исключения для каждого анализа определяется умножением фактора коррекции на среднее значение калибратора, полученного в шаге 1.
- Величина индекса – вычислите значение индекса для каждого образца делением значения ОП образца на значение ОП величины исключения, что получен в шаге 3.

Пример: ОП полученная для калибратора = 0,38, 0,42, 0,40  
 Средняя ОП для калибратора = 0,40  
 ОП для сыворотки пациента = 0,60  
 Фактор коррекции = 0,50  
 Значение ОП величины исключения =  
 $= 0,50 * 0,40 = 0,20$   
 Значение индекса =  $0,60 / 0,20 = 3,00$

### ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значение индекса	Интерпретация
$\leq 0,90$	Отрицательный
0,91-1,09	Сомнительный
$\geq 1,10$	Положительный

Образцы при сомнительном результате следует повторно анализировать. Если и дальше получено сомнительный результат, анализируйте альтернативным тестом или используйте новый образец.

### КОНВЕРСИЯ В МЕЖДУНАРОДНЫЕ ЕДИНИЦЫ

Международные единицы (МЕд) реактивности определяется согласно МЕд стандарту. Преобразование значения индекса в международные единицы проводится при использовании анализа регрессии. Каждый лот стандартизирован против международных единиц и поставляется с специфическим лоту таблицей преобразования (Преобразование международных единиц (МЕд) на мл для микросомальный IgG, M, A). Например (смотрите оригинал инструкции).

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Калибратор и контроли должны использоваться при каждом тесте.
- Реагент бланка должен быть  $\leq 0,15$  ОП при 450 нм.
- Средняя ОП для калибратора должна быть  $\geq 0,30$  при 450 нм.
- Значение индекса для высоко положительного, низко положительного и отрицательного контроля должны быть в своих соответствующих границах, указанных на флаконах. Если значения контролей не соответствуют диапазону, тест необходимо повторить.
- Если данные критерии не выполняются при повторении теста, обратитесь к производителю.

### ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

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

### ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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

### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

#### Чувствительность и специфичность

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

Таблица 1.

#### Чувствительность и специфичность DAI Microsomal ELISA набор

Альтернативный ELISA набор	DAI Microsomal ELISA набор			
	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

Сыворотка при сомнительном диапазоне была исключена из следующего вычисления:

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

Относительная специфичность = 84/86 = 97,7%

Относительное согласование = 109/111 = 98,2%

### Точность

Сем разных сывороток тестировались восемь раз каждая в три разные дни. Данные этого изучения представлены в таблице 2. При надлежащей технике пользователь должен получить КВ меньше, чем 15%.

Таблица 2. Данные точности

#### Анализ 1 (n=8)

Сыворотка	X	CO	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	CO	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	CO	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

#### Между тестовая точность (n=24)

Сыворотка	X	CO	КВ, %
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 – средний ISR

CO – стандартное отклонение

КВ – коэффициент вариации

### Линейность

Значение индекса DAI Microsomal был определен для серии двукратных разбавлений 5 положительных сывороток. Значение индекса сравнивалось с  $\log_2$  разбавления стандартной линейной регрессии. Данные таблицы 3 указывают, что анализ является полуквантитативным.

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. Линейная регрессия сравнивала значением индекса микросомов с  $\log_2$  разбавления.

### 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

Международные единицы стандарта Ед/мл	Значение индекса
500	8,37
2850	5,90
125	4,44
62,5	2,69
31	1,82
15	1,00

Линейная регрессия сравнивает значение индекса против международных единиц

$r^2=0,96$   $a=2,037$   $b=5,238$   $Y=$ индекс  $X=$ международные единицы

Уравнение вычисления экспоненциальной регрессии  
 $X= (Y+b)/a e^x=$  полученный МЕд/мл

### ДАННЫЕ ПЕРЕКРЕСТНОЙ РЕАКТИВНОСТИ

Сыворотка, содержащая высокий уровень антител к потенциально реактивным антигенам была протестирована DAI Microsomal ELISA набором. Данные в таблице 5 (смотрите оригинал инструкции) указывают, что антитела к альтернативным аутоиммунным антигенам не имеет перекрестной реактивности с DAI Microsomal ELISA набором.

#### Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»  
 Ул. Черновола, 97,  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 77 51 22  
 Тел/факс: (0342) 77 56 12  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

