

# НАБОР ИФА ДЛЯ ПРЯМОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgA В СЛЮНЕ

## DKO078, IgA Saliva ELISA

Каталог. № : **DKO078** Методика от **01-2015**  
Количество : **96**  
Производитель: **DiaMetra (Италия)**



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

### Для рутинных исследований

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор основан на конкурентном иммуноферментном методе, и предназначен для количественного определения IgA в слюне. Набор предназначен только для лабораторного использования.

#### 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

IgA составляет приблизительно 15-20% общего пула иммуноглобулинов крови, он также выявляется в слюзи, секретируемой в желудке, легких и кишечнике. Это является защитой от связывания микробов с эпителиальными клетками Респираторного и пищеварительного трактов. Этот иммуноглобулин помогает в борьбе с патогенами, контактирующими в поверхность тела, или проглоченными, или попавшими в респираторную систему при вдохе. Он существует в двух формах, IgA1 (90%) и IgA2 (10%), которые отличаются по структуре. IgA1 выявляется в сыворотке и продуцируется В-клетками костного мозга, тогда как IgA2 продуцируется В-клетками слизистой и секретируется в молозиво, материнское молоко, слезную жидкость и слюну.

IgA, выявляемый в секретах, обладает специфической формой. Это димер, связанный двумя дополнительными цепями. Одна из них, J цепь (от английского «join» - соединять), представляет собой полипептид с м.м. 1,5 кДа, богатый остатками цистеина, и структурно полностью отличающийся от других цепей иммуноглобулина. В димерной форме IgA внешних секретов также присутствует полипептид с м.м. 1,5 кД, называемый «секреторная цепь», продуцируемый эпителиальными клетками. Снижение или отсутствие IgA, называемое селективный IgA дефицит, может быть клинически значимым иммунодефицитом.

#### 2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Данный метод основан на одновременном связывании человеческого IgA с двумя типами антител, моноклональными антителами, иммобилизованными в лунках микропланшета, и другими, поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HPR). После инкубации разделение связавшихся и несвязавшихся компонентов происходит при промывке, а затем в лунки вносят раствор субстрата (ТМБ). Во время инкубации с субстратом развивается окрашивание, а затем ферментативную реакцию останавливают добавлением стоп-раствора, и определяют абсорбцию в лунках. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgA в образцах.

Концентрацию IgA в образцах рассчитывают на основании калибровочной кривой, построенной для серии стандартов.

#### 3. РЕАГЕНТЫ, МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

##### 3.1 Реагенты, поставляемые в наборе

- Калибраторы** (5 флаконов, 1 мл каждый)  
STD0 кат. № DCE002/7806-0  
STD1 кат. № DCE002/7807-0  
STD2 кат. № DCE002/7808-0  
STD3 кат. № DCE002/7809-0  
STD4 кат. № DCE002/7810-0
- Контроль IgA Saliva** (1 флакон, 1 мл)  
Концентрация Контроля специфична для каждой отдельной партии и указана в сертификате Контроля качества кат. № DCE045/7803-0
- IgA Рабочий Буфер, концентрат (5x)** (1 флакон, 40 мл)  
25 мМ Нерес буфер, pH 7.4; BSA 0.5 г/л кат. № DCE049/7849-0

- Концентрат Конъюгата 20X** (1 флакон, 1 мл)  
кат. № DCE002/7802-0  
Конъюгат IgA-HRP
- 96-луночный микропланшет**, покрытый антителами к IgA, в алюминиевом пакете  
кат. № DCE002/7803-0
- Субстрат ТМБ**  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ТМБ 0.26 г/л (избегайте контактов с кожей)  
кат. № DCE004-0
- Стоп-раствор (1 флакон, 15 мл)**  
Серная кислота 0.15 моль/л (избегайте контакта с кожей)  
кат. № DCE005-0
- Концентрат буфера для промывок, 50X** (1 флакон, 20 мл)  
NaCl 45 г/л, Tween-20 55 г/л  
кат. № DCE006-0

**3.2. Необходимые реагенты, не поставляемые с набором**  
Дистиллированная вода

##### 3.3. Дополнительные материалы и оборудование

Автоматические пипетки.  
Микропланшетный спектрофотометр (ридер)

##### Замечания:

*Храните все реагенты при +2... +8°C в темноте. Открывайте пакет с компонентом 5 (Покрытый микропланшет) только после того, как он достигнет комнатной температуры, и закрывайте его сразу после использования. Не снимайте адгезивную пленку с неиспользуемых стрипов.*

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Набор предназначен для использования в in-Vitro диагностике. Не для внутреннего или внешнего использования на людях или животных.
- Использовать соответствующую защитную одежду при работе с реагентами.
- Соблюдать установленные нормы при работе с продуктами кровяного происхождения.
- Реагенты содержат Проклин 300 в качестве консерванта.
- Не допускайте попадания прямого солнечного света, контакта реагента ТМБ/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с металлами или оксидантами.
- При растворении и внесении реагентов необходимо соблюдать максимальную точность.
- Не используйте реагентов из разных лотов.
- Не используйте сильно гемолизированные образцы.
- Данный метод позволяет проводить измерения IgA в диапазоне от 0.5 мкг/мл до 400 мкг/мл.

#### 5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Строго придерживаться временных шагов при пипетировании.
- Реагенты хранить охлажденными при 2-8 °С в оригинальной упаковке. Реагенты стабильны до окончания срока годности при соблюдении правил хранения и обращения с ними.
- Привести все компоненты и образцы к комнатной температуре (22-28 °С) перед использованием.
- Не смешивать содержимое из разных наборов. Не использовать после истечения срока годности.
- При использовании автоматического оборудования, убедиться в надежности тестирования оборудования.
- Неполное или не аккуратное удаление жидкости из лунок может повлиять на точность результатов.
- Время реакции в каждой лунке должно быть постоянным. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. Если требуется больше 10 минут, соблюдайте тот же порядок пипетирования. Если используется больше 1 планшета, рекомендуется повторить кривую для каждого планшета.
- Добавление ТМБ раствора инициирует кинетическую реакцию, которая останавливается добавлением стоп раствора. Поэтому ТМБ раствор и стоп раствор должны добавляться с одинаковыми интервалами.
- Соблюдать правила, установленные лабораторией, при работе с контролями и сывороткой.
- Максимальная точность необходима для восстановления и распределения реагентов.
- Образец (образцы) с микробной контаминацией не могут быть использованы для анализа данным методом. Не могут быть использованы образцы с сильным гемолизом или липемией.
- Измерения проводить вертикально. Не трогать дно лунок.

#### 6. ПРОЦЕДУРА

##### 6.1. Подготовка калибраторов (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

Калибраторы и Контроли готовы к использованию.  
В наборе поставляются Калибраторы со следующими

концентрациями:  
0 - 6.9 - 62 - 132 - 400 нг/мл

Концентрация стандартов в 1000 ниже, чем значения, указанные в диапазоне измеряемых значений, так как данный метод требует разведения образцов в 1000 раз, тогда как стандарты не разводят.  
**Концентрации Калибраторов для внесения в инструмент следующие:**

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
мкг/мл	0	6.9	62	132	400

Стабильность: после вскрытия стандарты стабильны в течение 6 месяцев при 2-8 °С.

### 6.2. Приготовление буфера для промывок

Разведите содержимое флакона с концентратом буфера для промывок со 160 мл дистиллированной или деионизированной воды в подходящей емкости. Для приготовления разных объемов соблюдать соотношение разведения 1:5. Храните при 2-8 °С до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона.

### 6.3. Подготовка разбавленного конъюгата

Приготовьте конъюгат непосредственно перед использованием. Внесите 50 мкл раствора конъюгата (реагент 4) в 950 мкл разбавленного рабочего буфера IgA (реагент 3). Количество разводимого конъюгата пропорционально проводимым тестам. Тщательно перемешать в течение 5 минут на вортексе. Стабилен 3 часа при КТ.

### 6.4. Подготовка Промывочного Раствора

Развести содержимое каждого флакона концентрата Промывочного раствора с дистиллированной водой до конечного объема 1000 мл. Для меньших объемов приготовить разведение 1:50. Разведенный Промывочный Раствор стабилен в течение 30 дней при 2-8 °С.

### 6.5. Подготовка образцов

Для сбора образцов необходимо использовать стеклянные центрифужные пробирки и пластиковые соломинки.

Дайте слюне стечь из соломинки в стеклянную центрифужную пробирку; затем центрифугируйте при 3000 об/мин в течение 15 минут.

Не используйте для сбора образцов слюны пластиковые пробирки или коммерчески доступные пробирки, чтобы не допустить ложных результатов.

**Приготовьте раствор А для каждого образца, для этого разведите полученный супернатант в соотношении 1:20 разбавленным рабочим буфером (50 мкл - 1 мл); тщательно перемешайте каждое разведение не менее чем 5 минут на шейкере, затем разведите приготовленное первое разведение еще в соотношении 1:50 разведенным рабочим буфером (20 мкл - 1 мл). Конечное разведение составит 1:1000.**

Тщательно и аккуратно перемешайте не менее, чем 5 минут на шейкере.

Если образец не будет протестирован в день взятия, его необходимо хранить замороженным при -20°C.

### 6.6. Процедура

- Привести все реагенты к комнатной температуре (22-28 °С) на протяжении минимум 30 минут. Неиспользуемые микропланшетные полоски хранить тщательно упакованными при 2-8 °С с осушителем.
- Во избежание микробного и/или химического загрязнения неиспользуемые реагенты не возвращать в оригинальные флаконы.
- Все определения необходимо выполнять в дублях. Приготовьте по две лунки для каждого из калибраторов (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	Калибратор	Образец/Контроль	Бланк
Калибраторы C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 мкл		
Разведенные образцы/контроли		25 мкл	
Разбавленный конъюгат	100 мкл	100 мкл	
Инкубируйте при 22-28 °С в течение 1 часа. Удалите содержимое всех лунок; промойте лунки разбавленным Промывочным раствором 3 раза, по 300 мкл на лунку.			
<b>Замечание:</b> в каждом шаге промывания осторожно потрясти планшет в течение 5 секунд и удалить остатки раствора переворачиванием на абсорбирующую бумагу.			
<b>Автоматический вошер:</b> если вы используете автоматическое оборудование, промывайте лунки минимум 5 раз.			
Субстрат ТМВ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Инкубируйте при комнатной температуре 22±28°C в течение 15 минут в темноте.			
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл	100 мкл

Аккуратно встряхнуть микропланшет.  
Считать абсорбцию (E) при длине волны 450 нм против бланка в течение 5 минут.

## 7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждая лаборатория должна анализировать контроли с нормальными, повышенными и сниженными уровнями свободного кортизола для контроля качества выполняемых исследований. Все контроли должны анализироваться при каждой постановке, точно также, в тех же условиях, что и образцы с неизвестными концентрациями.

Необходимо вести графики контроля качества для мониторинга параметров поставляемых реагентов. Используйте соответствующие статистические методы для определения трендов. Каждая лаборатория должна установить допустимый диапазон параметров выполнения метода. Среди других параметров необходимо проводить мониторинг 80, 50 и 20% пересечений стандартной кривой для воспроизводимости между сериями. Кроме того, полученная максимальная оптическая плотность должна согласовываться с результатами предыдущих постановок. Значительные отклонения от установленных параметров могут указывать незамеченные изменения в условиях эксперимента или деградации реагентов набора. Для определения причины отклонений необходимо использовать свежие реагенты.

## 8. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 8.1. Средняя абсорбция

Рассчитайте среднюю абсорбцию (Em) для каждой точки калибровочной кривой (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) и для каждого образца.

### 8.2. Подсчет результатов – автоматический метод

Для построения калибровочной кривой рекомендуется использовать следующие методы аппроксимации: 4-параметрический логистический, логистическая сигмоидная функция или гладкий кубический сплайн.

### 8.3. Подсчет результатов – построение вручную

Для расчета концентраций IgA в образцах используется калибровочная кривая.

1. Запишите значения абсорбции, полученные при считывании ОП в лунках.
2. Отложите средние значения абсорбции стандартов (Em) против соответствующих концентраций стандартов IgA, в мкг/мл, используя линейную графическую бумагу.
3. Проведите оптимальную кривую через полученные точки.
4. Для расчета концентраций IgA в образцах, найдите значение, соответствующее среднему значению абсорбции дублей образца, на вертикальной оси Y, определите точку пересечения с калибровочной кривой, и считайте концентрацию (в мкг/мл) по горизонтальной оси X.

## 9. КОНТРОЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

На основании литературных данных и результатах, полученных с использованием данного набора h-IgA DiaMetra, диапазон ожидаемых значений составил:

40-170 мкг/мл

## 10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 10.1. Чувствительность

Минимальная определяемая концентрация IgA, отличная от нулевого стандарта, составляет 0.5 мкг/мл при 95 % доверительном интервале.

### 10.2. Специфичность

Перекрестная реактивность антител была рассчитана при 50%, по Abraham, результаты приведены в таблице:

h IgA	100.0%
h IgA 1	124.5%
h IgA 2	145.5%
h IgG	< 0.3%
h IgM	< 0.3%

### 10.3. Корреляция с методом РИА

Данный метод Diametra свободный кортизол (ИФА) был сравнен с другим коммерчески доступным методом определения IgA. 22 образца сывороток были проанализированы обоими методами, согласно протоколам. Была получена следующая линейная регрессия:

$$y = 1.5865x - 7.614$$

$$r = 0.9478 \quad (r^2 = 0.8984)$$

#### 10.4. Хук эффект

При тестировании данным конкурентным методом IgA ELISA, не выявлено Хук эффекта до концентрации IgA 600 мкг/мл

#### 11. УТИЛИЗАЦИЯ ОТХОДОВ

Реагенты должны утилизироваться согласно локальным правилам.



#### **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)