

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 ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
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 разбавленным 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 (C₀-C₄) и каждого образца, и 1 лунку для бланка.

Реагент	Калибратор	Образец/Контроль	Бланк
Калибраторы C ₀ -C ₄	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.			
Замечание: в каждом шаге промывания осторожно потрясти планшет в течение 5 секунд и удалить остатки раствора переворачиванием на абсорбирующую бумагу.			
Автоматический вошер: 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 (C₀-C₄) 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. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com