

IgA Слини ІФА

Імуноферментний аналіз для визначення IgA людини в слині

REF **DM59171**

Σ 96

   2-8°C

EU: **IVD** **CE**



I B L I N T E R N A T I O N A L G M B H

Flughafenstrasse 52a
D-22335 Гамбург, Німеччина

Телефон: +49 (0)40-53 28 91-0
Факс: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@IBL-International.com
www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А,
оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Імуноферментний колOMETричний аналіз для кількісного визначення IgA в слині.

2 КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

IgA являє собою близько 15% до 20% імуноглобулінів у крові, вони також виявляються у слизу, секретується в шлунку, легенях та кишечнику. Це перешкоджає мікробам зв'язуватися з епітеліальними клітинами дихальних і травних шляхів. Цей імуноглобулін допомагає боротися з патогенами, які контактують з поверхнею організму, потрапляють всередину або вдихаються. Він існує у двох формах, IgA1 (90%) та IgA2 (10%), які відрізняються між собою будовою. IgA1 міститься в сироватці крові і виробляється В-клітинами кісткового мозку, проте IgA2 виробляється В-клітинами що знаходиться в слизовій оболонці, і було виявлено, що виділяються в молозиво, материнське молоко, сльози та слину.

Знайдені в секретах IgA мають особливу форму. Вони є димерними молекулами, пов'язаними двома додатковими ланцюгами. Однією з них є ланцюг J (з приєднання), який являє собою поліпептид молекулярної маси 1,5 кД, багатий на цистеїн і структурно повністю відрізняється від інших ланцюгів імуноглобулінів. Димерна форма IgA в зовнішньому секреті також має поліпептид тієї ж молекулярної маси (1,5 кД), який називається секреторним ланцюгом і виробляється епітеліальними клітинами. Зниження або відсутність IgA, що називається селективним дефіцитом IgA, може бути клінічно значущим імунодефіцитом.

3. ПРИНЦИП

Тест ІФА IgA з слини оснований на одночасному зв'язуванні IgA людини з двома антитілами, одним моноклональним, іммобілізованим на мікроплапланшеті та інших поліклональних, кон'югованих з пероксидазою хрому (HRP).

Після інкубації пов'язане / вільне розділення проводиться простим твердофазним промиванням.

Потім фермент у зв'язаній фракції взаємодіє із субстратом (H₂O₂) та субстратом ТМБ і розвивається синій колір, який змінюється на жовтий, коли додається стоп-розчин (H₂SO₄).

Інтенсивність кольору пропорційна концентрації IgA у зразку.

Концентрація IgA у зразку розраховується на основі стандартної кривої.

4 РЕАГЕНТ, МАТЕРІАЛ І ІНСТРУМЕНТАРІЙ

4.1 Реагент і матеріал, що постачається в наборі

Кількість	Символ	Компонент
1 розбірний мікропланшет	MTP	Мікропланшет розборний. Антитіла анти-IgA адсорбуються на мікропланшеті
1x1,0 мл	ENZCONJ CONC	Ферментний кон'югат концентрований (20 х) Містить: Антитіла проти IgA, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP)
5x1,0 мл	CAL 0-4	Стандарт 0-4.
1x1,0 мл	CONTROL	Контроль 1 + 2 Точні концентрації дивіться в сертифікаті КЯ.
1x40 мл	ASSAY BUF CONC	Буфер аналізу 5Хконцентрований Містить: Буфер Гепеса 25 мМ рН 7,4; BSA 0,5 г / л
1x20 мл	WASHBUF CONC	Концентрат буфера для промивання (50х) Містить: NaCl 45 г / л; Твін20 55 г / л.
1x15 мл	TMB SUBS	ТМБ Розчин субстрату Містить: H ₂ O ₂ -ТМБ 0,26 г / л (уникайте будь-яких контактів зі шкірою).
1x15 мл	STOP	стоп-розчин Містить 0,15 моль / л Сірчана кислота (уникайте контактів зі шкірою)

4.2 Реагенти, необхідні, не постачаються

Дистильована вода

4.3 Допоміжні матеріали та інструментарій

Автоматичний дозатор

Рідер мікропланшетів (450 нм, 620-630 нм)

Примітка

Зберігайте всі реагенти при 2 ° C - 8 ° C у темряві.

Відкривати пакет із мікропланшетом з покриттям (МТР) тільки тоді, коли він знаходиться при кімнатній температурі, і закривайте відразу після використання; один раз відкритий, мікропланшет стабільний до закінчення терміну придатності набору. Не знімайте клейкі листи на невикористаних стріпах.

5 ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Цей набір призначений для використання in vitro лише професійними особами. Не для внутрішнього чи зовнішнього застосування у людей або тварин.
- Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту під час роботи з наданими реагентами.
- Дотримуйтесь належної лабораторної практики (НЛП) щодо поводження з продуктами крові
- Деякі реагенти містять невелику кількість Proclin 300 як консервантів. Уникайте контакту зі шкірою або слизовою оболонкою.
- Субстрат ТМБ містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, поглинанні або поглинанні через шкіру. Не допускати травм, уникати вдихання, прийому всередину або контакту зі шкірою та очима.
- Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна та агресивна і може бути токсичною при попаданні в організм. Щоб запобігти хімічним опікам, уникайте контакту зі шкірою та очима.
- Уникайте потрапляння реагенту ТМБ / H₂O₂ на пряме сонячне світло, метали чи окислювачі. Не заморожуйте розчин.
- Цей спосіб дозволяє визначити IgA від 0,5 мкг / мл до 400 мкг / мл

6 ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Будь ласка, дотримуйтесь строго послідовності кроків піпетування, передбачених цим протоколом. Дані про ефективність, представлені тут, були отримані з використанням конкретних реагентів, перелічених у цій Інструкції по застосуванню.
- Усі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2 ° C - 8 ° C у їх оригінальному контейнері. Будь-які винятки однозначно вказано. Реагенти стабільні до терміну придатності при зберіганні та поводженні з ними, як зазначено.
- Не міняйте компоненти набору з різних партій. Дотримуйтесь терміну придатності, надрукованому на етикетках на коробці та флаконах. Не використовуйте будь-який компонент набору після закінчення строку їх дії.
- Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб комплект був належним чином перевірений.
- Неповне або неточне видалення рідини з лунок може впливати на точність аналізу та / або збільшити фон. Для підвищення продуктивності набору в автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивних кроків.
- Важливо, щоб час реакції в кожній лунці було постійним для відтворюваних результатів.

Піпетування зразків не слід тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути дрейфування. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтеся того ж порядку розподілу. Якщо використовується більше одного планшета, рекомендується повторити криву реакції на дозу для кожного планшета.

- Додавання розчину до субстрату ТМБ ініціює кінетичну реакцію, яка припиняється додаванням стоп розчину. Тому субстрат ТМБ і стоп-розчин повинні бути додані в тій же послідовності для усунення будь-якого відхилення в часі реакції.

- Дотримуйтеся вказівок щодо здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом визначення контролю та / або об'єднання сироваток.

- Максимальна точність необхідна для відновлення та дозування реагентів.

- Зразки, мікробіологічно забруднені, високоліпемічні або гемолізовані, не повинні використовуватися в аналізі.

- Рідери планшетів вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунок.

7 ПРОЦЕДУРА

7.1 Підготовка стандарту

(CAL 0, CAL 1, CAL 2, CAL 3, CAL 4)

Стандарти та контроль готові до використання.

Стандарти мають таку концентрацію: 0; 6,9; 62; 132; 400 нг / мл

Стандартна концентрація в 1000 разів нижча за значення, повідомлені в контрольному діапазоні, оскільки зразки розводять 1: 1000, тоді як стандарти не розбавляють.

Концентрації Стандартів, що вводяться в прилад для розрахунків, є:

	Кал 0	Кал 1	Кал 2	Кал 3	Кал 4
мкг/мл	0	6,9	62	132	400

Після відкриття стандарти стабільні 6 місяців при температурі 2 ° С - 8 ° С.

7.2. Приготування буфера для аналізу IgA

Розведіть вміст 5-кратного конц. IgA буферу для аналізу з 160 мл дистильованої або дейонізованої води у відповідний контейнер для зберігання. Для приготування різних обсягів дотримуйтеся коефіцієнту розведення 1: 5. Зберігати при температурі 2 - 8 ° С до терміну придатності, надрукованому на етикетці.

7.3 Приготування розведеного кон'югата

Підготуйте безпосередньо перед використанням.

Додайте 50 мкл кон'югату (ENZCONJ) до 950мкл розведеного буфера аналізу IgA (реагент 3). Кількість розведеного кон'югату пропорційна за кількістю тестів. Акуратно перемішайте протягом 5 хвилин, обертаючи міксером. Стабільний протягом 3 годин при кімнатній температурі (22 - 28 ° С).

7.4 Приготування промивного розчину

Вміст флакона буферного промивання (WASHBUF) концентрату (50x) розвести дистильованою водою до кінцевої об'єм 1000 мл перед використанням. Для менших обсягів дотримуйтеся коефіцієнта розведення 1:50. Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при температурі 2 ° С - 8 ° С.

7.5 Підготовка зразка

Для збору зразків рекомендується використовувати центрифужну скляну пробірку і пластикову соломинку. Нехай слина стікає через соломинку в скляну трубку для центрифуги; потім центрифугуйте при 3000 об / хв. 15 хвилин.

Не використовуйте пластмасові пробірки або комерційно доступні пристрої для збору слини, щоб уникнути помилкових результатів.

Приготуйте розчин А для кожного зразка шляхом розведення рідкої рідини супернатанту 1:20 розведеним буфером для аналізу (тобто: 50 мкл до 1 мл); потім обережно перемішуйте кожен розчин А, залишаючи його принаймні на 5 хвилин в обертовим шейкері і розвести цей 1:50 розведеним буфером для аналізу (тобто: 20 мкл до 1 мл). Остаточне розведення отримане: 1:1000.

Акуратно перемішайте, залишивши її принаймні на 5 хвилин на обертовим шейкері.

Якщо аналіз не проводиться в один і той же день збору, зберігайте слину при температурі -20 ° С.

7.6 Процедура

Дозвольте всім реагентам досягти кімнатної температури (22 ° С - 28 ° С) протягом принаймні 30 хвилин, зберігайте реактиви при 2-8 ° С: уникайте тривалого впливу кімнатної температури.

Невикористані покриті стріпи мікропланшету повинні бути надійно запечатані у пакеті з фольги, що містить осушувач, і зберігатись при 2 ° С - 8 ° С.

Щоб уникнути можливого мікробного та / або хімічного забруднення, невикористані реагенти ніколи не слід переносити в оригінальні флакони

Оскільки визначення потрібно виконати у двох примірниках, щоб підвищити точність результатів тесту, підготуйте дві лунки для кожної точки стандартної кривої (Кал 0-Кал 4) дві для кожного контролю, дві для кожного зразка і одну для порожньої (бланк).

реагент	стандарт	Зразок/контроль	Бланк (порожня)
Стандарт Кал0-Кал 4	25 мкл		
Розведені зразки/контроль		25 мкл	
Розведений кон'югат	100 мкл	100 мкл	
Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі (22 - 28°C).			
Вийміть вміст з кожної лунки; промийте лунки тричі 300 мкл розведеного промивного розчину. Важлива примітка: Під час кожного кроку промивки обережно струсіть планшет протягом 5 секунд і видаліть зайвий розчин, постукуючи перевернутою пластиною об абсорбентний паперовий рушник. Можна використовувати автоматичний вошер для промивання. Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, промийте лунки мінімум 5 разів.			
ТМБ субстрат	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Інкубуйте при кімнатній температурі 22 ° С - 28 ° С протягом 15 хвилин у темряві.			
Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
Акуратно струсіть мікропланшет. Виміряйте оптичну густину за допомогою фотометра на 450 нм із референтною довжиною хвилі: 620-630 нм або проти бланк протягом 5 хв			

8 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна проводити аналіз контролів в нормальному, високому та низькому діапазоні рівня IgA для моніторингу виконання. Ці контролі слід розглядати як невідомі та значення визначаються в кожній виконаній процедурі аналізу. Графіки контролю якості повинні вестись для того, щоб відстежувати продуктивність реагентів, що постачаються. Для встановлення тенденцій слід застосовувати статистичні методи. Індивідуально лабораторія повинна встановити прийнятні межі продуктивності аналізу. Інші параметри, які слід контролювати, включають 80, 50 та 20% перехоплення стандартної кривої для відтворюваності прогону до прогону. Крім того, максимальне поглинання повинно відповідати минулому досвіду. Значне відхилення від встановлених показників може свідчити про непомітну зміну експериментальних умов або деградацію реагентів набору. Для визначення причини виникнення змін слід використовувати свіжі реагенти.

9 РЕЗУЛЬТАТИ

9.1 Середнє поглинання

Обчисліть середнє значення поглинання (ОГ) для кожної точки стандартної кривої та кожного зразка.

9.2. Розрахунок результатів - автоматичний метод

Використовуйте методи: 4 параметри логістики, сигмоподібна логістика або згладжений кубічний сплайн, як алгоритм обчислення.

9.3. Розрахунок результатів - Ручний метод

Крива реакції на дозу використовується для визначення концентрації IgA у невідомих зразках.

1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки рідера мікропланшетів.
2. Нанесіть поглинання для кожного дублікату сироватки порівняно з відповідною концентрацією IgA в мкг / мл на лінійному паперовому графі.
3. З'єднайте точку з найкращим чином відповідною кривою.
4. Для визначення концентрації IgA для невідомих зразків знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого зразка на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій та зчитують концентрацію (у мкг / мл) від горизонтальної осі графіка (дублікати невідомі може бути усереднено, як зазначено)

10 РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ

Виходячи з літературних даних та результатів, отриманих ІФА слини ІФА, високо підсумовані діапазони нормальності: 40 - 170 мкг / мл

Зверніть увагу на те, що визначення діапазону очікуваних значень для "нормальної" популяції в даному методі залежить від багатьох факторів, таких як специфіка та чутливість використовуваного методу та тип населення, яке досліджується. Тому кожна лабораторія повинна розглядати діапазон, що надається виробником як загальну індикацію та виробляти власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де лабораторія працює.

11 ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

11.1. Чутливість

Найнижча виявлена концентрація слини IgA, яку можна відрізнити від нульового стандарту (CAL 0) становить 0,5 мкг / мл при границі достовірності 95%.

11.2. Специфічність

Перехресна реакція антитіла, розрахована на 50% за даними Авраама, наведена в таблиці:

h IgA 100,0%

h IgA1 124,5%

h IgA2 145,5%

h IgG <0,3%

h IgM <0,3%

11.3. Кореляція з RIA

ІФА слини IgA порівнювали з іншим комерційно доступним аналізом IgA. 22 зразка сироватки були проаналізовані згідно з обома тест-системами.

Обчислювали криву лінійної регресії

$$y = 1,5865x - 7,614$$

$$r = 0,9478 (r^2 = 0,8984)$$

11.4. Хук-ефект.

ІФА слини IgA не виявляє Хук - ефекту до 600 мкг / мл

12. УПРАВЛІННЯ ВІДХОДАМИ

Реагенти слід утилізувати відповідно до місцевих норм

13. БІБЛІОГРАФІЯ

- Tomasi, T.B. Jr. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. (1976)
- Ben-Aryeh H., et al Archive of Oral Biol. 35, 929-931 (1990)
 - Smith D.J., et al J. Dental Research 66, 451-456 (1987)
 - Ventura M.T. et al Allergol Immunopath (madr) 19, 183-185 (1991)
 - Kugler J., et al J. Clin. Immunol. 12, 45-49 (1992)
 - Jemmott III J.B. et al Behavioral Medicine, 15, 63-71 (1989)
 - Gregory R.I., et al J. Period. Research, 27, 176-183 (1992)
 - Ruan M.S., Chung-Hua-Kou-Chiang-Hsueh-Tsa-Chin, 25, 158-160 (1990)
 - Jemmot III J.B., et al J. Personality and Social Psychology 55, 803-810 (1988)
 - Kugler J.A review. Psychotherapy, Psychosomatic Medicine and Psychology, 41, 232-242 (1991)
 - Shirtcliff E.A., et al Psychoneuroendocrinology, 26, 165-173 (2001)
 - Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related technics

14 ВИРІШЕННЯ МОЖЛИВИХ ПРИЧИН ПОМИЛОК/ ПРОБЛЕМ

Немає колориметричної реакції

- відсутня реакція кон'югації пікетування після додавання
- забруднення кон'югатів та / або субстрату
- помилки при виконанні процедури аналізу (наприклад, випадкове піпетування реагентів у неправильній послідовності або з неправильного флакону тощо)

Занадто низька реакція (занадто низькі ОГ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто короткий, температура інкубації занадто низька









Занадто висока реакція (занадто високі ОГ)

- неправильний кон'югат (наприклад, не з оригінального набору)
- час інкубації занадто довгий, температура інкубації занадто висока
- якість води для буфера для промивання недостатня (низький ступінь дейонізації)
- недостатнє промивання (кон'югати не видалені належним чином)

Незрозумілі явні відхилення

- забруднення піпеток, наконечників або контейнерів
- недостатнє промивання (кон'югати не видалені належним чином)
- реагенти та / або стріпи, не нагріті попередньо до кімнатної температури CV % перед використанням, занадто високо між прогонами
- вошер для миття планшетів не миє правильно (пропозиція: чиста головка вошера) занадто висока між пробігом – умови інкубації не постійні (час, температура CV%)
- контролі та зразки, які не видаються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірити порядок піпетування)
- залежна від особи варіація


УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати подаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОВОГО (-ИХ) НАБОРУ (IV). ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

	IBL International GmbH	Тел .:	+ 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
	Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина	E-MAIL:	IBL@IBL-International.com
		WEB:	http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м.Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua