



**IMMUNOASSAYS AND SERVICES**

**BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY**

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

## Інструкція з використання ІФА слини ІgА

**REF** SA E-6800



**IVD**

**CE**

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18, info@novamedline.com. [www.novamedline.com](http://www.novamedline.com)

## **ІФА слини ІgА**

### **ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ**

Імуноферментний колориметричний метод кількісного визначення ІgА в слині.  
ІФА ІgА слини призначений лише для лабораторного використання.

### **КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ**

ІgА становить приблизно 15-20% імуноглобулінів в крові, вони також містяться в слизу, що виділяється в шлунку, легенях і кишечнику. Це не дозволяє мікробам зв'язуватися з епітеліальними клітинами дихальних шляхів і травного тракту. Цей імуноглобулін допомагає боротися з патогенами, які контактують з поверхнею тіла, потрапляють всередину або вдихаються. Він існує у двох формах: ІgА1 (90%) і ІgА2 (10%), які відрізняються за структурою. ІgА1 міститься в сироватці крові і виробляється В-клітинами кісткового мозку, однак ІgА2 виробляється В-клітинами, розташованими в слизових оболонках, і, як було виявлено, виділяється в молозиво, материнське молоко, сльози та слину.

ІgА, що міститься в виділеннях, має особливу форму. Вони являють собою димерні молекули, з'єднані двома додатковими ланцюгами. Одним з них є ланцюг J (від join), який являє собою поліпептид з молекулярною масою 1,5 кД, багатий цистеїном і структурно повністю відмінний від інших ланцюгів імуноглобуліну. Димерна форма ІgА у зовнішніх секретах також містить поліпептид з такою ж молекулярною масою (1,5 кД), який називається секреторним ланцюгом, і виробляється епітеліальними клітинами.

Знижений або відсутній ІgА, який називається селективним дефіцитом ІgА, може бути клінічно значущим імунодефіцитом.

### **ПРИНЦИП**

ІФА на ІgА слини заснований на одночасному зв'язуванні людського ІgА з двома антитілами, одним моноклональним, іммобілізованим на мікроланкових планшетах, а іншим, поліклональним, кон'югованим з пероксидазою хрому (HRP). Після інкубації розділення зв'язаного/вільного здійснюється простим твердофазним промиванням.

Потім фермент у зв'язаній фракції реагує з субстратом (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) та субстратом ТМБ і набуває синього кольору, який змінюється на жовтий, коли Стоп-розчин (H<sub>2</sub>ТАК<sub>4</sub>) додається.

Інтенсивність кольору пропорційна концентрації ІgА у зразку.

Концентрацію ІgА у зразку розраховують за стандартною кривою.

### **РЕАГЕНТ, МАТЕРІАЛ ТА ІНСТРУМЕНТАЦІЯ**

#### **Реактиви та матеріали, що входять у набір**

#### **Стандарти**

	кіт. немає.	Стандартний	Обсяг/флакон
STANDARD A	SA E-6801	Стандарт А (CAL 0)	1 мл
STANDARD B	SA E-6802	Стандарт В (CAL 1)	1 мл
STANDARD C	SA E-6803	Стандарт С (CAL 2)	1 мл
STANDARD D	SA E-6804	Стандарт D (CAL 3)	1 мл
STANDARD E	SA E-6805	Стандарт E (CAL 4)	1 мл

#### **CONTROL**

#### **SA E-6851 Контроль**

1 флакон, 1 мл; Концентрація контролю залежить від партії і вказується в сертифікаті аналізу.

#### **SA E-6813 Буфер для аналізу** (5-кратна концентрація)

1 флакон, 40 мл; Нерес буфер 25 мМ рН 7,4; БСА 0,5 г/л

#### **SA E-6840 Ферментний кон'югат** (20-кратна концентрація)

1 флакон, 1 мл; Антитіла до ІgА, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP)

#### **96**

#### **SA E-6831 Мікротитраційні лунки з покриттям 1**

мікропланшет, що розбивається; Антитіла до ІgА, адсорбовані на мікропланшеті

**SUBSTRATE MS E-0055 ТМБ-субстрат**

1 флакон, 15 мл;  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ТМВ 0,26 г/л (уникайте будь-якого контакту зі шкірою)

**STOP-SOLN MS E-0080 Стоп Розчин**

1 флакон, 15 мл; Сірчана кислота 0,15 моль/л (уникайте будь-якого контакту зі шкірою)

Ідентифікація  
небезпек:



H290 Може бути корозійним для металів.

H314 Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей.

**WASH-CONC 50x SA E-0030 Промивний розчин (50-кратна концентрація)**

1 флакон, 20 мл; NaCl 45 г/л; Твін-20 55 г/л

**Необхідні реагенти не поставляються**

Дистильована вода

**Допоміжні матеріали та прилади**

Автоматичний дозатор

Рідер мікропланшетів (450 нм, 620-630 нм)

**Примітка**

Зберігати всі реагенти при температурі від 2 °C до 8 °C у темному місці.

Відкривайте пакет з реагентом 5 (Coated Microplate), тільки коли він буде кімнатної температури, і закривайте його відразу після використання; після відкриття він стабільний до закінчення терміну придатності набору. Не видаляйте клейкі листи на невикористаних смугах.

**ПОПЕРЕДЖЕННЯ**

Цей набір призначений для використання in vitro лише професійними особами. Не для внутрішнього або зовнішнього застосування у людей або тварин.

Використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту під час роботи з наданими реагентами. Дотримуйтесь належної лабораторної практики (НЛП) для поводження з препаратами крові.

Деякі реагенти містять невеликі кількості Proclin 300® як консерванти. Уникайте контакту зі шкірою або слизовими оболонками.

Субстрат ТМБ містить подразник, який може бути шкідливим при вдиханні, ковтанні або всмоктуванні через шкіру. Щоб уникнути травм, уникайте вдихання, ковтання або контакту зі шкірою та очима.

Стоп-розчин складається з розведеного розчину сірчаної кислоти. Сірчана кислота отруйна і їдка і може бути токсичною при попаданні всередину. Щоб уникнути хімічних опіків, уникайте контакту зі шкірою та очима.

Уникайте впливу реагенту ТМВ/ $\text{H}_2\text{O}_2$  на пряме сонячне світло, метали або окислювачі. Не заморожуйте розчин.

Цей метод дозволяє визначити IgA від 0,5 мкг/мл до 400 мкг/мл.

**ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ**

Будь ласка, суворо дотримуйтесь послідовності кроків піпетування, наведених в цьому протоколі. Дані про продуктивність, представлені тут, були отримані за допомогою конкретних реагентів, перелічених у цій Інструкції з використання.

Усі реагенти слід зберігати в холодильнику при температурі 2 °C - 8 °C в оригінальній упаковці. Будь-які винятки чітко вказано. Реагенти стабільні до закінчення терміну придатності за умови зберігання та поводження, як зазначено.

Дайте всім компонентам і зразкам набору досягти кімнатної температури (22 °C - 28 °C) і ретельно перемішати перед використанням.

Не міняйте місцями компоненти комплекту з різних партій. Необхідно дотримуватись терміну придатності, надрукованого на етикетці упаковки та флакона. Не використовуйте будь-які компоненти набору після закінчення терміну їх придатності.

Якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, користувач несе відповідальність за те, щоб набір був належним чином перевірений.

Неповне або неточне видалення рідини з лунок може вплинути на точність аналізу та/або збільшити фон. Для підвищення продуктивності набору на автоматичних системах рекомендується збільшити кількість промивань.

Важливо, щоб час реакції в кожній лунці підтримувався постійним для відтворюваних результатів. Піпетування зразків не повинно тривати більше десяти хвилин, щоб уникнути дрейфу аналізу. Якщо потрібно більше 10 хвилин, дотримуйтеся того ж порядку дозування. Якщо використовується більше одного планшета, рекомендується повторити криву дози-відповіді на кожній чашці

Додавання розчину ТМБ Субстрат ініціює кінетичну реакцію, яка припиняється додаванням Стоп-розчину. Тому субстрат ТМБ і стоп-розчин слід додавати в однаковій послідовності, щоб виключити будь-яке відхилення у часі під час реакції.

Дотримуйтеся рекомендацій щодо здійснення контролю якості в медичних лабораторіях шляхом аналізу контрольних та/або об'єднаних сироваток.

Для відновлення та дозування реагентів потрібна максимальна точність.

Зразки мікробіологічно забруднені, сильно липемічні або гемолізовані не повинні використовуватися для аналізу.

Рідери планшетів вимірюють вертикально. Не торкайтеся дна лунок.

## ПРОЦЕДУРА

### Підготовка стандартів

Стандарти та контроль готові до використання.

Стандарти мають таку концентрацію:

0 - 6,9 - 62 - 132 - 400 нг/мл.

Стандартні концентрації в 1000 разів нижчі за значення, зазначені в еталонному діапазоні, оскільки зразки розведені 1:1000, а стандарти не розведені.

### Стандартні концентрації, які вводяться в інструменти для розрахунку:

	A	B	C	D	E
мкг/мл	0	6,9	62	132	400

Після відкриття стандарти стабільні протягом 6 місяців при 2 °C - 8 °C.

### Приготування буфера для аналізу IgA

Розведіть вміст 5X Conc. Буфер для аналізу IgA з 160 мл дистильованої або деіонізованої води у відповідному контейнері для зберігання.

Для приготування різних об'ємів дотримуйтеся співвідношення 1:5.

Зберігати при температурі 2 °C - 8 °C до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці.

### Приготування розведеного кон'югату

Готувати безпосередньо перед використанням.

Додайте 50 мкл кон'югату (реагент 4) до 950 мкл розведеного буфера для аналізу IgA (реагент 3).

Кількість розведеного кон'югату пропорційна кількості тестів.

Обережно перемішуйте 5 хвилин, обертаючим міксером.

Стабільний протягом 3 годин при кімнатній температурі (22 °C - 28 °C).

### Приготування промивного розчину

Розведіть вміст кожного флакона 50X Conc. Перед використанням розчин промийте дистильованою водою до кінцевого об'єму 1000 мл.

Для менших об'ємів дотримуйтеся співвідношення 1:50.

Розведений промивний розчин стабільний протягом 30 днів при температурі 2 °C - 8 °C.

### Підготовка зразка

Для відбору проб рекомендується використовувати скляну пробірку для центрифуги і пластикову соломинку.

Дайте слині стекти через соломинку в скляну пробірку центрифуги; потім центрифугувати при 3000 об/хв за 15 хвилин.

Не використовуйте пластикові трубки або наявні у продажу пристрої для збору слини, щоб уникнути помилкових результатів.

**Приготуйте розведення А для кожного зразка, розбавивши рідину супернатанту 1:20 розведеним буфером для аналізу (наприклад: 50 мкл + 950 мкл); потім обережно перемішайте кожне розведення А, залишаючи його щонайменше на 5 хвилин на обертовому шейкері, і розведіть це розведення А 1:50 розведеним буфером для аналізу (наприклад: 20 мкл + 980 мкл).**

**Отримане остаточне розведення: 1:1000.**

Обережно перемішайте, залишивши принаймні на 5 хвилин на обертовому шейкері.  
Якщо аналіз не проводиться в день збору, зберігайте слину при -20 °С.

**Процедура**

**Дайте всім реагентам нагрітися до кімнатної температури (22 °С - 28 °С) протягом щонайменше 30 хвилин.** Після закінчення аналізу негайно зберігайте реагенти при 2 °С - 8 °С: уникайте тривалого впливу кімнатної температури.

Невикористані стріпи з покритими мікролунками слід надійно запечатати в пакет із фольги, що містить осушувач, і зберігати при температурі 2 °С - 8 °С.

Щоб уникнути потенційного мікробного та/або хімічного забруднення, невикористані реагенти ніколи не переміщуйте в оригінальні флакони.

Оскільки визначення необхідно виконувати в дублікатах, щоб підвищити точність результатів тесту, підготуйте дві лунки для кожної точки стандартної кривої (Стандарт АЕ), дві для кожного контролю, дві для кожного зразка, одну для пустої.

Реактив	Стандарт	Зразок / Контроль	Бланк
Стандартний АЕ	25 мкл		
Розведені зразки / контроль		25 мкл	
Розведений кон'югат	100 мкл	100 мкл	

Інкубувати 1 годину при кімнатній температурі (22 °С - 28 °С).

Видаліть вміст з кожної лунки; промийте лунки тричі 300 мкл розведеного промивного розчину.

**Важлива примітка:** під час кожного етапу миття обережно струшуйте планшет протягом 5 секунд і видаліть надлишок розчину, постукуючи перевернутим планшетом по вбираючому паперовому рушнику.

**Автоматична мийка:** якщо ви використовуєте автоматизоване обладнання, промивайте лунки не менше 5 разів.

Розчин субстрату ТМБ	100 мкл	100 мкл	100 мкл
----------------------	---------	---------	---------

Інкубувати 15 хвилин у темряві при кімнатній температурі (22 °С - 28 °С).

Стоп розчин	100 мкл	100 мкл	100 мкл
-------------	---------	---------	---------

Обережно струсіть мікропланшет.

Зчитуйте поглинання (Е) при 450 нм проти еталону довжина хвилі 620-630 нм або проти Бланка протягом 5 хвилин.

**РЕЗУЛЬТАТИ****Середня абсорбція**

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

**Розрахунок результатів – автоматичний метод**

Використовуйте метод: 4 параметричний логістичний, сигмоподібний логістичний або згладжений кубічний сплайн, як алгоритм обчислення.

**Розрахунок результатів – ручний метод**

Крива доза-відповідь використовується для визначення концентрації IgA у невідомих зразках.

1. Запишіть поглинання, отримане з роздруківки пристрою для зчитування мікропланшетів.
2. Нанесіть графік поглинання для кожного дублікату еталонної сироватки від відповідної концентрації IgA в мкг/мл на лінійному міліметровому папері.
3. З'єднайте точку за допомогою кривої, яка найкраще підходить.
4. Щоб визначити концентрацію IgA для невідомих зразків, знайдіть середнє поглинання дублікатів для кожного невідомого зразка на вертикальній осі графіка, знайдіть точку перетину на кривій і зчитайте концентрацію (в мкг/мл) з горизонтальної вісь графіка (дублікати невідомого можна усереднювати, як зазначено).

## РЕФЕРЕНТНІ ЗНАЧЕННЯ

На основі даних літератури та результатів, отриманих за допомогою ІФА слини IgA, діапазон норми становить:

	<b>IgA слина</b>
<b>Діапазон нормальності</b>	40-170 мкг/мл

Будь ласка, зверніть увагу на той факт, що визначення діапазону очікуваних значень для «нормальної» популяції за даним методом залежить від багатьох факторів, таких як специфічність та чутливість використовуваного методу та тип досліджуваної сукупності. Тому кожна лабораторія повинна розглядати діапазон, наданий виробником, як загальну вказівку та виробляти власний діапазон очікуваних значень на основі корінного населення, де працює лабораторія.

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ

### Чутливість

Найнижча виявлена концентрація h-IgA, яку можна відрізнити від стандарту А, становить 0,5 мкг/мл за межі довіри 95 %.

### Специфіка

Перехресна реакція антитіла, розрахована на 50% за Абрахамом, показана в таблиці:

<b>h IgA</b>	<b>100,0 %</b>
h IgA1	124,5 %
h IgA2	145,5 %
h IgG	< 0,3 %
h IgM	< 0,3 %

### Співвідношення з RIA

ІФА на слину IgA порівнювали з іншим доступним у продажу IgA аналізом. 22 зразки сироватки були проаналізовані відповідно до обох тест-систем.

Була розрахована крива лінійної регресії

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

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

### Хук Ефект

ІФА IgA слини не показує Хук ефекту до 600 мкг/мл

## ПОВОДЖЕННЯ З ВІДХОДАМИ

Реагенти необхідно утилізувати відповідно до місцевих правил.

## **Література**

1. Томасі, Т.Б.-молодший, Енглвуд Кліфс, Нью-Джерсі: Прентіс-Холл. (1976)
2. Бен-Ар'є Х. та ін Архів усної біол. 35, 929-931 (1990)
3. Smith DJ та інші J. Dental Research 66, 451-456 (1987)
4. Ventura MT et al Allergol Immunopath (madr) 19, 183-185 (1991)
5. Kugler J. та ін. J. Clin. Immunol. 12, 45-49 (1992)
6. Jemmott III JB et al Behavioral Medicine, 15, 63-71 (1989)
7. Gregory RI, et al J. Period. Дослідження, 27, 176-183 (1992)
8. Ruan MS, Chung-Hua-Kou-Chiang-Hsueh-Tsa-Chin, 25, 158-160 (1990)
9. Jemmot III JB, et al J. Personality and Social Psychology 55, 803-810 (1988)
10. Kugler JA огляд. Психотерапія, психосоматична медицина та психологія, 41, 232-242 (1991)
11. Shirtcliff EA, et al Psychoneuroendocrinology, 26, 165-173 (2001)
12. Чард Т. Вступ до радіоімунного аналізу та супутніх методів

## ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ

### МОЖЛИВІ ПРИЧИНИ ПОМИЛКИ / ПРОПОЗИЦІЇ

#### Колориметричної реакції немає

відсутня реакція піпетування кон'югату після додавання забруднення кон'югатів та/або субстрату помилки під час виконання процедури аналізу (наприклад, випадкове піпетування реагентів у неправильній послідовності або з неправильного флакона тощо)

#### Занадто низька реакція (занадто низькі ОГ)

неправильна 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) надто довгий час інкубації, занадто висока температура інкубації якість води для промивного буфера недостатня (низька ступінь деіонізації) недостатня промивка (кон'югати не видаляються належним чином)

#### Нез'ясовні виходи

забруднення піпеток, наконечників або контейнерів недостатнє промивання (кон'югати не видаляються належним чином)

#### Занадто високий рівень у виконанні (CV%)

реагенти та/або смужки, попередньо не нагріті до кімнатної температури перед використанням, мийка планшетів не мие належним чином (пропозиція: очистити головку мийки)

#### Занадто високий рівень між циклами (CV%)

умови інкубації непостійні (час, температура) контролі та зразки, які не відпускаються одночасно (з однаковими інтервалами) (перевірте порядок піпетування) відхилення, пов'язані з людиною

**Щоб отримати оновлену літературу або іншу інформацію, зверніться до місцевого постачальника.**

## УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

 Температура зберігання	 Виробник	 Містить достатньо для <N> випробувань
 Дата закінчення терміну придатності	<b>LOT</b> Код партії	<b>IVD</b> Тільки для ін вітро діагностики в лабораторних умовах!
 Звертайтеся до інструкції по експлуатації	<b>CONT</b> зміст	<b>CE</b> CE Маркування
 <b>УВАГА ! ОБЕРЕЖНО !</b>	<b>REF</b> каталожний номер	<b>RUO</b> тільки для дослідницького використання !