

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕКРЕТОРНОГО IgA В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ «секреторный IgA-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «секреторный IgA-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации секреторного IgA в биологических жидкостях (см. таблицу М) методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Секреторный IgA (sIgA) является основным иммуноглобулином, представленным в секретах слизистых оболочек и экзокринных желез. Около 90% sIgA синтезируется местно и не попадает в кровоток. По структуре и антигенным свойствам sIgA принципиально отличается от сывороточного IgA тем, что представляет собой комплекс из трех разных по происхождению и строению молекул. В состав sIgA входит две (или 4) молекулы IgA с молекулярной массой 160 КДа каждая, объединяющая их J-цепь (16 КДа) и секреторный компонент (80 КДа), который присоединяется в процессе трансэпителиального транспорта полимерного IgA.

1.3. sIgA играет важную роль в местном иммунитете организма, препятствуя прикреплению и проникновению бактерий и вирусов через эпителий, связывая патогены, попадающие в биологические жидкости, а также нейтрализуя вирусы, проникшие внутрь эпителиальных клеток.

1.4. Ряд показателей резистентности организма к инфекции коррелирует с уровнем sIgA-антител в экстраваскулярных жидкостях. Определение концентрации sIgA позволяет получить информацию о состоянии местного иммунитета и используется при диагностике и контроле эффективности лечения заболеваний полости рта, дыхательных, пищеварительных и мочеполовых органов.

1.5. В крови увеличение концентрации sIgA наблюдается при заболеваниях печени, при ряде аутоиммунных заболеваний, а также при некоторых опухолях.

1.6. Количественное определение sIgA требует специальных систем детекции, которые учитывают особенности строения этой комплексной молекулы.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение секреторного IgA основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к секреторному IgA человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание секреторного IgA, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к альфа-цепи IgA с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидаина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации секреторного IgA в исследуемом образце. Концентрацию секреторного IgA в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания секреторного IgA в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Перекрестная реакция мышинных моноклональных антител к секреторному IgA с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
IgG	<0.1
IgM	<0.1
IgE	<0.1

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания секреторного IgA в одном и том же образце биологических жидкостей с использованием Набора «секреторный IgA-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации секреторного IgA в образцах биологических жидкостей при разведении их биологическими жидкостями, не содержащей секреторный IgA, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 2-400 мкг/мл и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации секреторного IgA предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 20 мкг/мл. Процент «открытия» составляет 90-110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «секреторный IgA-ИФА» концентрация секреторного IgA в биологических жидкостях не превышает 0.6 мкг/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P276Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стерилизованный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C276Z	CAL 1-6	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7,2-7,4), содержащие известные количества секретонного IgA – 0; 2; 20; 40; 100; 400 мкг/мл , готовы к использованию (по 1 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости ярко-синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q276Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием секретонного IgA, готова к использованию (1 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T276Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость ярко-красного цвета
5 S012Z2	DIL	Красный ИФА-Буфер , готов к использованию (22 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
6 S011Z4	DIL SPE	ИФА-Буфер , готов к использованию (100 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
7 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
10 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
11 K276I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «секреторный IgA-ИФА»	1	шт.	-
12 K276Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «секреторный IgA-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0.1$ °С;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25-250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25$ °С) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8$ °С в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «секреторный IgA-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- ИФА-Буфер, конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации секреторного IgA в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. ВНИМАТЕЛЬНО: объем внесения калибровочной пробы/контрольной сыворотки в лунки планшета отличается от объема внесения исследуемых образцов!
2	Разбавьте образцы слюны в 101 раз, используя ИФА-Буфер (S011Z4). Пример: 5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов. Способ разведения для других видов материала приведен в таблице М. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Если предполагается концентрация секреторного IgA в исследуемом образце превышает 400 мкг/мл, его следует дополнительно развести, используя ИФА-Буфер (S011Z4). Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца биологических жидкостей.
4	Внесите в лунки планшета предназначенные для образцов слюны по 190 мкл красного ИФА-Буфера. При исследовании других видов материала объем вносимого красного ИФА-Буфера указан в таблице М.
5	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл каждой калибровочной пробы и контрольной сыворотки. При исследовании слюны в лунки, предназначенные для исследуемых образцов, внесите по 10 мкл разбавленных образцов. При исследовании других видов материала объем вносимого исследуемого образца указан в таблице М. Внесение калибровочной пробы, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
6	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 90 минут при температуре +37 °С.
7	По окончании инкубации удалите содержимое лунки аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунки.
8	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
9	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
10	По окончании инкубации удалите содержимое лунки и отмойте лунки 5 раз.
11	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина . Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10-20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
12	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунки окрашивается в ярко-желтый цвет.
13	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 1,5 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра представляйте по калибровочной пробе С1.

продолжение таблицы на стр. 8

14	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – концентрация секреторного IgA в калибровочных пробах (мкг/мл), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
15	Определите по калибровочному графику содержание секреторного IgA в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п.2), умножьте полученный результат на фактор разведения. При анализе различных видов материала необходимо умножить полученные значения на фактор пересчета, приведенный в таблице М.

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	красный ИФА-Буфер в лунку, мкл	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
сыворотка (плазма) крови	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	0	100	0.05
слюна	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	190	10	1.0
моча*	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	10 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	0	100	0.025
бронхоальвеолярная жидкость *	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	0	100	0.05
назальный смыв*	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	80	20	0.25
вагинальный секрет	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных образцов может привести к искажению результатов.	5 мкл образца + 500 мкл буфера для разведения образцов	90	10	0.5
грудное молоко	Тщательно перемешайте образец непосредственно перед разбавлением.	5 мкл образца + 2500 мкл буфера для разведения образцов	195	5	10

* ТОЛЬКО для научных исследований

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций секреторного IgA в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.6 мкг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (400 мкг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация секреторного IgA ниже 0.6 мкг/мл или выше 400 мкг/мл.

Исследуемая группа	Единицы	
	мкг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
сыворотка крови	1.6	5.0
слюна	57	260
моча	0.5	2.7
грудное молоко	800	-

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Heiddis B. Valdimarsdottir and Arthur A. Stone – Psychosocial Factors and Secretory Immunoglobulin A. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, Jan 1997; 8: 461-474.
2. Amir H Abdul Latiff and Michael A Kerr – The clinical significance of immunoglobulin A deficiency. Ann Clin Biochem, Mar 2007; 44: 131-139.