

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgA ДО АНТИГЕНУ CagA HELICOBACTER PYLORI

CagA IgA

Кат. №: **CAGA.CE**

Дата випуску інструкції: **01-2020**
Версія: **5**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл IgA до антигену гена A, пов'язаного з цитотоксином Helicobacter pylori, у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення антитіл IgA до антигену гена A, пов'язаного з цитотоксином Helicobacter pylori, або CagA-Ag в сироватці/плазмі. Продукт призначений для спостереження за пацієнтами з шлунково-кишковими патологіями, пов'язаними з інфекцією H.Pylori.

Тільки для діагностики in vitro.

В. ВСТУП

Helicobacter pylori (Hr) - грамнегативна бактерія, вперше виділена в слизовій оболонці шлунка Маршаллом і Уорреном у 1983 році.

Було визнано, що Hr є агентом, відповідальним за більшість випадків пошкодження слизової оболонки шлунка, і відіграє роль у еволюції захворювань шлунка до карциноми.

Нещодавно були помічені вірулентні штами, що демонструють цитотоксин з високомолекулярною масою, який складається з мономерів 87 кДа (kDa), що спричиняє вакуолізацію епітеліальних клітин (токсин VacA) та серйозні пошкодження слизової оболонки шлунка.

Також спостерігали протеїн, пов'язаний з VacA, що виробляється в штаммах, які несуть споріднений ген і мають молекулярну масу 128 кДа (kDa). Цей білок під назвою CagA-Ag є імуногенним і стимулює у пацієнта вироблення специфічних антитіл, як класів IgG, так і IgA.

Їх реактивність у пацієнта вважається клінічною ознакою наявності високовірулентного штаму H.Pylori, а для IgA – гострої триваючої інфекції.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті специфічним для Helicobacter Pylori синтетичним антигеном CagA-Ag.

Під час 1-ї інкубації твердої фази обробляють розведеними зразками, і анти CagA-Ag IgA захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти CagA-Ag IgA виявляються шляхом додавання антитіла до hIgA, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл CagA-Ag IgA, присутніх у зразку.

IgA у зразку можна кількісно визначити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної в довільних одиницях на мілілітр дов.Од/мл (arbU/ml), оскільки немає міжнародного стандарту.

Інтерференції через наявність IgG блокуються безпосередньо в лунці шляхом додавання адсорбенту анти-hIgG.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих синтетичним CagA-Ag. Пластини запечатані в пакет з осушувачем.

Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітисся до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Калібрувальна крива: CAL №...

Готова до використання та кодована кольорами стандартна крива з діапазоном:

4 мл (ml) CAL1 = 0 дов.Од/мл (arbU/ml)

4 мл (ml) CAL2 = 5 дов.Од/мл (arbU/ml)

2 мл (ml) CAL3 = 10 дов.Од/мл (arbU/ml)

2 мл (ml) CAL4 = 20 дов.Од/мл (arbU/ml)

2 мл (ml) CAL5 = 50 дов.Од/мл (arbU/ml)

4 мл (ml) CAL6 = 100 дов.Од/мл (arbU/ml).

Стандарти відкалібровані за внутрішнім золотим стандартом або IGS, оскільки міжнародного не визначено.

Містить білки сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6/0 +/-0/1, 0/1% Tween 20, 0/09% Na-азид і 0/045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти мають синій колір.

3. Контрольна сироватка: CONTROL ... ml

1 флакон. Ліофілізована. Містить білки фетальної сироватки великої рогатої худоби, антитіла IgA людини до CagA-Ag у концентрації приблизно 20 дов.Од/мл (arbU/ml) ± 20%, 0,3 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

4. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин.

Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgA людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфер pH 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

6. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

7. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

8. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

9. Нейтралізуючий реагент: SOLN NEUT

1 x 8 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання реагент. Містить козячий анти-hIgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

10. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

11. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000, 100 і 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 повторних використання пристрою протягом 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на

приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.

2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату, створюючи хибно негативні результати.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виб'яте з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Використані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Калібрувальна крива:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Контрольна сироватка:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Контроль після розчинення не стабільний. Зберігати в замороженому вигляді аликвот при -20 °C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20X бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2...8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не надавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник зразка:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази**:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази**:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M (M) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μ/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилок позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск +/- 5%.
5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 nm (nm) та другим фільтром 620-630 nm (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 nm (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані,

контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекоменується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластикою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розчиніть вміст Контрольної Сироватки, як повідомлялося.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
8. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
9. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
10. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Набір можна використовувати для кількісних і якісних визначень.

M1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунки A1 та B1 порожніми для операції бланкування.
3. Внесіть 50 мкл (μl) Нейтралізуючого Реагенту (SOLN NTR) у всі лунки для зразків. Не додавайте його в лунки, які використовуються для Калібраторів і Контрольної Сироватки!

Важлива примітка: Нейтралізуючий Реагент здатний блокувати хібнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були отримані як позитивні за допомогою IVD, який не здійснює жодної реакції блокування РФ.

- Потім внесіть 100 мкл (μl) Калібратора та 100 мкл (μl) Контрольної Сироватки в двох примірниках. Потім внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклеєні клейкою уцілювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ І.3).
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунок А1 та В1 для бланкування і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунок А1 та В1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.
- Промийте мікролунки, як описано раніше (розділ І.3).
- У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунки А1 та В1 для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1 або В1 чи на обох.

М2. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

Якщо потрібне лише якісне визначення, дійте, як описано нижче:

- Розведіть зразки 1:101 у правильно позначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір для Калібрування, оскільки калібратори готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
- Внесіть 50 мкл (μl) Нейтралізуючого Реагенту (SOLN NTR) у всі лунки для зразків. Не додавайте його в лунки, які використовуються для Калібраторів!

Важлива примітка: Нейтралізуючий Реагент здатний блокувати хібнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були отримані як позитивні за допомогою ІVD, який не здійснює жодної реакції блокування РФ.

- Внесіть 100 мкл (μl) Калібратора 0 дов.Од/мл (arbU/ml) і Калібратора 5 дов.Од/мл (arbU/ml) в дублях та Калібратора 100 дов.Од/мл (arbU/ml) в одному примірнику. Потім внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклеєні клейкою уцілювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ І.3).
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в кожну лунку, окрім лунок А1 і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунок А1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.
- Промийте мікролунки, як описано в кроці 5.
- У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1.

Важливі загальні зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хібнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Нейтралізуючий реагент (тільки для зразків)	50 мкл (μl)
Калібратори та Контроль(*)	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- Контрольна Сироватка (CS) не впливає на підрахунок результатів тесту.
- Контрольна Сироватка (CS) використовується лише в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче наведено приклад схеми розподілу для кількісного аналізу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1										
B	BLK	CAL4	S 2										
C	CAL1	CAL5	S 3										
D	CAL1	CAL5	S 4										
E	CAL2	CAL6	S 5										
F	CAL2	CAL6	S 6										
G	CAL3	CS (*)	S 7										
H	CAL3	CS (*)	S 8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок
CS (*) = Контрольна Сироватка - не обов'язкове

Нижче наведено приклад схеми розподілу в якісних аналізах:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11										
B	CAL1	S 4	S 12										
C	CAL1	S 5	S 13										
D	CAL2	S 6	S 14										
E	CAL2	S 7	S 15										
F	CAL6	S 8	S 16										
G	S1	S 9	S 17										
H	S2	S 10	S 18										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратори S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу є відповідними.

Переконайтесь, що досягнуто наступних результатів:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення OD450 нм (nm)
CAL1 0 дов.Од/мл (arbU/ml)	< 0.150 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації < 30%
CAL2 5 дов.Од/мл (arbU/ml)	OD450 нм (nm) > OD450 нм (nm) CAL1 + 0.100
CAL6 100 дов.Од/мл (arbU/ml)	OD450 нм (nm) > 1.000

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 OD450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
CAL1 0 дов.Од/мл (arbU/ml) > 0.150 OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний м'який розчин, а перед використанням вошера був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
CAL2 5 дов.Од/мл (arbU/ml) OD450 нм (nm) < OD450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
CAL6 100 дов.Од/мл (arbU/ml) < 1.000 OD450 нм (nm)	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в

	попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.
--	--

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем після перевірки, повідомте про цю проблему керівнику для подальших дій.

** Примітка:

Якщо використовувалася Контрольна Сироватка, перевірте такі дані:

Проблема	Перевірити
Контрольна Сироватка	Середнє значення OD450 нм (nm) CAL 4 ± 20%

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, дійте наступним чином:

Проблема	Перевірити
Контрольна Сироватка Відрізняється від очікуваного значення	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення контролю не сталася помилка (внесення неправильного калібратора); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, CAL1, CAL2, CAL6) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

Важлива примітка:

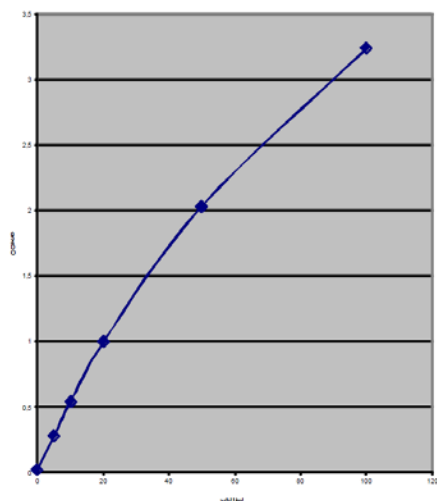
Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 12.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р.1 Кількісний метод

Якщо тест виявиться дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму побудови кривої, щоб накреслити калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами). Потім за калібрувальною кривою розрахуйте концентрацію антитіл анти-CagA-Ag IgA у зразках.

Нижче наведено приклад калібрувальної кривої.



Важлива примітка:

Не використовуйте наведену вище калібрувальну криву для розрахунків.

Р.2 Якісний метод

У якісному методі розрахуйте середні значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для калібраторів 0 і 5 дов.Од/мл (arbU/ml), а потім перевірте, що аналіз дійсний.

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як крок читання, описаний у розділі М, пункт 12):

Примітка: Наведені нижче дані не повинні використовуватися замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Калібратор 0 дов.Од/мл (arbU/ml): 0.020 – 0.024 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0/022 OD450 нм (nm)
Нижче 0.150 - Приймається

Калібратор 5 дов.Од/мл (arbU/ml): 0.250 – 0.270 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.260 OD450 нм (nm)
Вищий, ніж CAL0 + 0.100 – Приймається

Калібратор 100 дов.Од/мл (arbU/ml): 2.045 OD450 нм (nm)
Більше 1.000 – Приймається

OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Калібратора 5 дов.Од/мл (arbU/ml) вважається граничним значенням Cut-off (або Co) системи.
Співвідношення між значенням OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка та OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Калібратора 5 дов.Од/мл (arbU/ml) (або S/Co) може забезпечити напівкількісну оцінку вмісту специфічного анти-CagA-Ag IgA у зразку.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 5 дов.Од/мл (arbU/ml) вважаються негативними на антитіла до CagA-Ag IgA.
Зразки з концентрацією вище 5 дов.Од/мл (arbU/ml) вважаються позитивними на антитіла до CagA-Ag IgA.
Концентрації вище 50 дов.Од/мл (arbU/ml) анти-CagA IgA можуть бути важливим діагностичним доказом триваючої активної інфекції та зазвичай корелюють із клінічними ознаками шлунково-кишкових розладів, спричинених *H.Pylori*.

Важливі примітки:

- Самих лише результатів CagA-Ag IgA *H.Pylori* недостатньо для встановлення чіткого діагнозу інфекції *Helicobacter pylori*. Необхідно провести інші тести на *Helicobacter Pylori* (постачаються Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. під кат. № HPAG.CE, HPA.CE, HPG.CE та HPM.CE).
- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз повинен поставлений і переданий пацієнту лікарем з відповідною кваліфікацією.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена на панелях позитивних і негативних зразків у зовнішній клінічній лабораторії з посиланням на схвалений FDA референсний набір.

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл CagA-Ag IgA.
За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий від пацієнта з минулим інфікуванням HP, щоб забезпечити постійну та чудову чутливість пристрою.

2. Діагностична Чутливість та Специфічність

Діагностичні показники оцінювалися на зразках, наданих зовнішнім центром, з чудовим досвідом діагностики інфекційних захворювань.
Діагностичну чутливість досліджували на більш ніж 50 зразках, попередньо позитивних з референсним набором європейського походження, що використовується в лабораторії. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією інфекції *H.Pylori*.
Діагностична специфічність була визначена на панелях із понад 100 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, які можуть інтерферувати.
Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.
Заморожені зразки також були перевірені, щоб визначити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту.
На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось.
Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	> 98 %
Специфічність	> 98 %

3. Відтворюваність

Дослідження, проведене на трьох зразках різної реактивності анти-CagA-Ag IgA, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах, показало значення CV% в діапазоні 4-20% залежно від показань OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm).
Отримана варіабельність не призвела до неправильної класифікації зразків.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції.
Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибнопозитивні результати.

T. ЛІТЕРАТУРА

- Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
- Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
- Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
- Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556.
- Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
- Oderda G. et al.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
- Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
- Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.
- Warren J.R. et al.. Lancet (1983), 45, 1273-1275.
- Goodwin C.S. et al.. Int.Syst.Bacteriol. (1989), 39, 397-405.
- Blaser M.J. et al.. Gastroenterology (1987), 93, 371-383.
- Dooley C.P. et al.. N.Engl.J.Med. (1989), 321, 1562-1566.
- Parsonnet J. Et al.. N.Engl.J.Med. (1991), 325, 1127-1131.
- Leying H. et al.. Mol.Microbiol. (1992), 6, 2863-2874.
- Perez-Perez G.I. et al.. Infect.Immun. (1992), 60, 3658-3663.
- Cover T.L. et al.. J.Biol.Chem. (1992), 267, 10570-10575.
- Lenuk R.D. et al.. Rev.Infect.Dis. (1991), 13, 5685-5689.
- Crabtree J.E. et al.. J.Clin.Pathol. (1992), 45, 733-734.
- Cover T.L. et al.. Infect.Immun. (1990), 58, 603-610.
- Gerstenecker B. et al.. Eur.J.Clin.Microbiol. (1992), 11, 595-601.
- Cussac V. et al.. J.Bacteriol. (1992), 174, 2466-2473.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic BioProbes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс с.р.л.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

