

НАБІР РЕАГЕНТІВ

HELICOBACTER PYLORI АНТИГЕН (В КАЛІ) ELISA

Helicobacter pylori Ag (stool) ELISA

Каталог. № : EIA-6120

Дата випуску інструкції: 2019/12

Кількість : 96

Версія: 2.0



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

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей ІФА набір на основі мікропланшетів (імуноферментний аналіз) призначений для кількісного та якісного виявлення антигену Helicobacter pylori в калі. Аналіз є корисним інструментом для виявлення активної інфекції H. pylori. Цей набір призначений лише для діагностики in vitro.

2 КОРОТКИЙ ОПИС ФІЗІОЛОГІЇ

H. pylori (раніше відомі як *Campylobacter pyloridis*) - це тип бактерій, який інфікує шлунок і є частою причиною пептичної виразки. Бактерії *H. pylori* можуть передаватися від людини до людини при безпосередньому контакті зі слиною, блювотою або каловими речовинами. *H. pylori*, також може поширюватися через заражену їжу або воду.

Зазвичай інфекція набувається в дитинстві. *H. pylori* зазвичай не діагностується, доки не з'являються симптоми пептичної виразки. Інфекція *H. pylori* є досить поширеною і зустрічається приблизно у половини людей у світі.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Цей ІФА аналіз типу "сендвіч" розроблений, розвинений та виготовлений для кількісного та якісного вимірювання антигену *H. pylori* в зразку калу. Аналіз використовує техніку імуноферментного аналізу на основі мікропланшетів, наносячи високоочищене антитіло на стінку мікротитрових лунок.

Калібратори для аналізу та зразок калу додають у мікротитрові лунки мікропланшету, який покритий високоочищеним моноклональним антитілом *H. pylori* на його стінці. Під час аналізу антиген *H. pylori* буде зв'язаний з антитілом, яким покритий планшет після інкубаційного періоду. Незв'язаний матеріал змивається і додається інше кон'юговане з HRP моноклональне антитіло, яке специфічно розпізнає білок *H. pylori*, для подальших імунореакцій. Після інкубаційного періоду утворюється імунокомплекс "H. pylori Антитіло - антиген *H. pylori* - кон'югований з HRP індикатор анти-*H. pylori*", якщо в досліджуваному зразку присутній антиген *H. pylori*. Незв'язане антитіло-індикатор та інші білки в буферній матриці видаляють на наступній стадії промивання. Потім кон'юговане HRP антитіло-індикатор, зв'язане з лункою, інкубують з розчином субстрату під час реакції, а потім вимірюють у спектрофотометричному зчитувачі мікропланшетів. Ферментативна активність антитіла-індикатора, зв'язаного з білками *H. pylori*, захопленими на стінці кожної мікротитрової лунки, прямо пропорційна кількості антигену *H. pylori* в кожному досліджуваному зразку.

4 РЕАГЕНТИ: ПІДГОТОВКА І ЗБЕРІГАННЯ

Після отримання, даний тест-набір слід зберігати при температурі 2 -8 °С. Термін придатності набору дивитися на етикетці. Всі компоненти стабільні до закінчення терміну придатності.

1. Мікропланшет, покритий антитілом *H.pylori*

Мікропланшет, покритий антитілом *H.pylori*

К-сть: 1x 96 лунок

Зберігання: 2°C - 8°C

Підготовка: Готовий до використання

2. Показник антитіла до *H. pylori*

HRP-кон'юговане моноклональне антитіло *H. pylori* у стабілізованій білковій матриці.

К-сть: 1 x12 мл

Зберігання: 2°C - 8°C

Підготовка: Готове до використання.

3. ІФА субстрат HRP

Тетраметилбензидин (ТМБ) зі стабілізованим перекисом водню.

К-сть: 1 x 12 мл

Зберігання: 2°C - 8°C

Підготовка: Готовий до використання.

4. ІФА стоп-розчин

0,5 М сірчаної кислоти.

К-сть: 1 x 12 мл

Зберігання: 2°C - 25°C

Підготовка: Готова до використання.

5. Калібратори 1- 6 антигену *H. pylori*

Калібратор у матриці на основі альбуміну бичачої сироватки з консервантом прокліну.

К-сть: 6 флаконів

Зберігання: 2°C - 8°C, <-20°C для тривалого зберігання

Не більше 3 циклів замороження-розмороження

Підготовка: Готовий до використання.

Контролі антигену *H. pylori*

Калібратор у матриці на основі альбуміну бичачої сироватки з консервантом прокліну.

К-сть: 2 флакони

Зберігання: 2°C - 8°C, <-20°C для тривалого зберігання

Не більше 3 циклів замороження-розмороження

Підготовка: Готовий до використання.

ІФА промивний концентрат

Сурфактант у фосфатному сольовому розчині з неазидним консервантом.

К-сть: 1 x 30 мл

Зберігання: 2°C - 25°C

Підготовка: 30X концентрат. Вміст слід розвести з 870 мл

дистильованої води та добре перемішати перед використанням.

6. Концентрований буфер для аналізу *H. pylori*

Концентрована буферна матриця зі стабілізаторами білка та консервантом, яка служить розріджувачем для зразка пацієнта, що містить сурфактант у забуференому фосфатом фізіологічному розчині з неазидним консервантом.

К-сть: 1 x 30 мл

Зберігання: 2°C - 8°C

Підготовка: 4X концентрат. Вміст слід розвести з 90 мл дистильованої води та добре перемішати перед використанням.

5 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

Реагенти призначені тільки для діагностики in vitro.

Вихідний матеріал, що містить реагенти бичачого сироваткового альбуміну, був отриманий у сусідніх 48 США. Його отримували лише із здорових тварин-донорів, які утримувались під ветеринарним наглядом та не мали заразних хвороб. Носити рукавички під час проведення цього аналізу та поводитись з реагентами так, ніби вони є потенційно інфекційними. уникати контакту з реагентами, які містять перекис водню, або сірчану кислоту. Не допускати попадання в очі, на шкіру чи на одяг. Не вдихати та не ковтати випари. При попаданні, промити великою кількістю води протягом 15 хвилин. Дотримуватися Належної Лабораторної Практики.

6 НЕОБХІДНЕ ОБЛАДНАННЯ, ЯКЕ НЕ ПОСТАЧАЄТЬСЯ

1. Прецизійні одноканальні дозатори об'ємом 10 мкл, 25 мкл, 50 мкл, 65 мкл, 100 мкл та 1000 мкл.
2. Багаторазовий диспенсер на 100 мкл
3. Одноразові наконечники для дозаторів для дозування більшого обсягу.
4. Одноразові скляні або пластикові пробірки 12 x 75 мм
5. Одноразова пластикова баночка з кришечкою об'ємом 1000 мл.
6. Алюмінієва фольга.
7. Пластикова кришка для мікротитрових лунок або поліетиленова плівка.
8. ІФА багатоканальна баночка для миття або автоматична (напівавтоматична) миюча система.
9. Спектрофотометричний мікропланшетний зчитувач з роздільною здатністю 450 нм.

7 ЗАБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКА

Свіжий зразок калу слід зібрати у контейнер для забору зразків калу. Необхідно зібрати мінімум 1 – 2 мл рідкого зразка калу або 1-2 г твердого зразка.

Отриманий зразок калу слід транспортувати до лабораторії замороженим (-20°C). Якщо зразок калу зібраний і буде тестуватися у той самий день, то дозволяється його зберігати при температурі 2°C - 8°C.

8 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

8.1 Підготовка реагентів

1. Перед використанням дати усім реагентам досягнути кімнатної температури (20°C - 25°C). Реагенти з набору різних номерів партії

- Концентрований буфер для аналізу перед використанням слід розвести до робочого розчину. Детальніше див. у розділі РЕАГЕНТИ.
- ІФА Промивний Концентрат слід розвести перед використанням до робочого розчину. Детальніше див. у розділі РЕАГЕНТИ.

8.2 Підготовка зразка

8.2.1 Тільки для процедури зважування вручну

- Зразки пацієнта слід розвести **1:24** 1x буфером для аналізу перед початком вимірювання.
- Позначте пробірку (12 x 75 мм) або пластиковий флакон об'ємом 4 мл.
- З твердим зразком стільця візьміть або зважте еквівалентну кількість (близько 40 мг, розміром як зерно рису) за допомогою шпателя або одноразової інюкуляційної петлі. Суспендувати твердий зразок калу з **1 мл 1x буфера для аналізу** і добре перемішати на вихровому змішувачі.
- Центрифугуйте розведений зразок калу при 3000 об / хв (800 - 1500 г) протягом 5-10 хвилин. Супернатант можна використовувати безпосередньо для аналізу. Як альтернативу центрифугуванню, залишіть на 30 хвилин розбавлений зразок відстоятися і осісти, та візьміть прозорий супернатант для тестування.
- Примітка: Якщо процедура випробування проводиться на автоматизованій системі ІФА, супернатант повинен бути без частинок шляхом центрифугування зразка.
- Цей зразок можна зберігати при температурі від 2 ° C до 8 ° C до трьох (3) днів і нижче -20 ° C для більш тривалого зберігання. Уникайте більше 3-кратного циклу заморожування та відтавання.

8.2.2 Використання пристроїв для збору зразків калу, KAT. EIA-6121 або KAT. EIA-6122

- Позначте пробірку для збору зразків калу.
- Дотримуйтесь інструкцій щодо пробірки для збору зразків, KAT. EIA-6121 або KAT. EIA-6122.
- Цей зразок можна зберігати при температурі від 2 ° C до 8 ° C до трьох (3) днів і нижче -20 ° C для більш тривалого зберігання. Уникайте більше 3-кратного циклу заморожування та відтавання.
- Дві краплі витягнутого зразка еквівалентно 100 мкл.
- Примітка:
Тест-набір збору зразків *H. pylori* (EIA-6122) підходить як для автоматизованої роботи системи ІФА, так і для процедури ручного аналізу.
Набір для збору та екстракції зразків фекальної *H. pylori* (EIA-6121) найбільш підходить для ручного аналізу.

8.3 Процедура якісного аналізу

- Помістіть достатню кількість мікролункових смужок у тримач для запуску позитивного контролю, (калібратор антигену *H. pylori* 6 рівнів), негативний контроль (розведений 1x буфер для аналізу), у двох примірниках.
- Конфігурація тесту

Рядок	Смуга 1	Смуга 2	Смуга 3
A	Негативний контроль	ЗРАЗОК 3	ЗРАЗОК 7
B	Негативний контроль	ЗРАЗОК 3	ЗРАЗОК 7
C	Позитивний контроль	ЗРАЗОК 4	ЗРАЗОК 8
D	Позитивний контроль	ЗРАЗОК 4	ЗРАЗОК 8
E	ЗРАЗОК 1	ЗРАЗОК 5	ЗРАЗОК 9
F	ЗРАЗОК 1	ЗРАЗОК 5	ЗРАЗОК 9
G	ЗРАЗОК 2	ЗРАЗОК 6	ЗРАЗОК 10
H	ЗРАЗОК 2	ЗРАЗОК 6	ЗРАЗОК 10

- Додайте **100 мкл** калібраторів, контролів та зразків у призначені мікролунки.

Примітка: якщо використовуються пробірки для збору з EIA-6121, додайте дві краплі витягнутого зразка калу в кожну лунку.

- Накрити планшет ущільнювачем для планшетів та алюмінієвою фольгою. Інкубуйте **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 60 хвилин**.
- Зніміть ущільнювач планшета. Аспіруйте вміст кожної лунки. Промийте кожну лунку **5 разів**, додаючи **350 мкл розведеного** промивного розчину в кожну лунку, а потім повністю аспіруйте вміст. В якості альтернативи, можна використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів.
- Додайте по 100 мкл антитіла-індикатора до *H.pylori* у кожну лунку. Змішайте, обережно постукуючи по планшеті.
- Накрийте планшет одним ущільнювачем та алюмінієвою фольгою. Інкубуйте **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 30 хвилин**.
- Зніміть ущільнювач планшета. Аспіруйте вміст кожної лунки. Промийте кожну лунку **5 разів**, додаючи **350 мкл розведеного** промивного розчину в кожну лунку, а потім повністю аспіруйте вміст.

В якості альтернативи, можна використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів.

- Додайте **100 мкл** ІФА субстрату HRP у кожну лунку. Змішайте, обережно постукуючи по планшеті.
- Накрити планшет одним ущільнювачем та алюмінієвою фольгою. Інкубуйте **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 20 хвилин**.
- Зніміть алюмінієву фольгу та ущільнювач для планшетів. Додайте **100 мкл** стоп-розчину ІФА у кожну лунку. Змішайте, обережно постукуючи по планшеті.
- Зчитайте абсорбцію при 450 нм **протягом 10 хвилин** за допомогою зчитувача мікропланшетів.

9 ПРОЦЕДУРНІ ПРИМІТКИ

- Рекомендується аналізувати усі контролі та невідомі зразки у двох примірниках. Середнє значення поглинання кожного дубліката слід використовувати для зменшення даних та обчислення результату.
- Зберігайте світлочутливі реагенти в оригінальних баночках бурштинового кольору. Зберігайте невикористані смужки, покриті антитілами, у фольговому zip-пакеті з осушувачем для захисту від вологи. Вплив вологості на планшети різко зменшує термін зберігання.
- Для забезпечення відтворюваності тесту необхідна ретельна техніка та використання правильно відкаліброваних дозаторів.
- Час інкубації або температури, відмінні від зазначених у цій інструкції, можуть вплинути на результати.
- Уникайте утворення повітряних бульбашок у мікролунках, оскільки це може призвести до нижчої ефективності зв'язування та вищого % KB повторних зчитувань.
- Перед використанням всі реагенти слід обережно та ретельно перемішати. Уникайте піноутворення.

10 ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Візуальне:

- Позитивне або реактивне: будь-яка лунка зразка, яка, очевидно, більш жовта, ніж лунка негативного контролю.
- Негативне або нереактивне: Будь-яка лунка зразка, яка, очевидно, не є більш жовтою, ніж лунка негативного контролю.

Примітка: Негативний контроль, як і деякі зразки пацієнтів, може мати злегка жовтий колір. Лунка для зразка повинна бути очевидно темнішою або більш жовтою, ніж лунка негативного контролю, коли це інтерпретується як позитивний результат.

ІФА Зчитувач:

- Обчисліть середню абсорбцію для кожної пари дубльованих результатів тесту.
- Обчисліть cut-off
Позитивне cut-off = 1.1 × (середня екстинкція негативного контролю + 0.10)
Негативне cut-off = 0.9 × (середня екстинкція негативного контролю + 0.10)
- Інтерпретувати результати тесту.
 - Позитивний: екстинкція зразків пацієнта перевищує позитивний cut-off
 - Негативний: екстинкція зразків пацієнта менше, ніж негативний cut-off
 - Сумнівний: екстинкція зразків пацієнта відбувається між позитивним і негативним cut-off.
- Аналізувати контроль якості:
 - Позитивний контроль повинен показувати середнє значення ОЩ більше ніж 0.8.
 - Негативний контроль повинен показувати середнє значення ОЩ менше ніж 0.18.

11 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Результати, отримані за допомогою цього набору ІФА антиген *Helicobacter pylori* (стілець), слугують лише допоміжним засобом для діагностики, а слід брати до уваги й інші клінічні дані, такі як ендоскопія та біопсія шлунку, тощо.
- Самі негативні результати *H.pylori* у пацієнтів, що не отримували лікування, не виключають зараження *H. pylori*.
- Для невідомого значення зразка, зчитаного безпосередньо з аналізу, яке перевищує найвищий калібратор, рекомендується виміряти ще один розведений зразок для більш точного вимірювання.
- Бактеріальне або грибкове забруднення зразків сироватки або реагентів, або перехресне забруднення між реагентами може спричинити помилкові результати.

12 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для забезпечення достовірності результатів кожен аналіз повинен включати відповідні контролю з відомими рівнями антигену *H. pylori*. Ми рекомендуємо, щоб усі аналізи включали власний контроль лабораторії.

13 ОЧІКУВАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

13.1 Кількісне вимірювання

Стілець 25 здорових дорослих вимірювали цим ІФА. Ми виявили, що у здорових людей виявляється невизначений антиген *H. pylori* в екстрагованому зразку калу відповідно до процедур збору, екстракції та аналізу, описаних у цій інструкції. Запропоноване позитивна cut-off для фекального антигену *H. pylori* становить 3 нг / мл.

13.2 Якісне вимірювання

Зразки калу з 29 негативних зразків та 17 позитивних зразків тестували за допомогою цього ІФА.

Зразки DRG ІФА	Зразки		Загальний
	Справді позитивний	Справді негативний	
Позитивний	17	0	17
Негативний	0	29	29
Загальний	17	29	46

Чутливість: 100% (17/17)

Специфічність: 100% (29/29)

Точність: 100% (46/46)

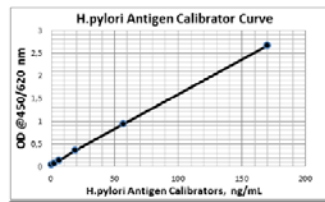
14 ПРИКЛАД ДАНИХ

14.1 Кількісне вимірювання

Показані типові дані поглинання та отримана крива калібратора від ІФА антигену *Helicobacter pylori* (стілець).

Примітка: Цю криву не слід використовувати замість запуску кривої калібратора з кожним аналізом.

Well I.D.	Reading Absorbance (450/620 nm)			Concentration
	Readings	Average	Corrected	
Calibrator Level 1 0 ng/mL	0.047 0.047	0.047	0.000	
Calibrator Level 2 2.1 ng/mL	0.075 0.071	0.073	0.026	
Calibrator Level 3 6.3 ng/mL	0.140 0.144	0.142	0.095	
Calibrator Level 4 16.9 ng/mL	0.357 0.368	0.363	0.316	
Calibrator Level 5 56.7 ng/mL	0.909 0.968	0.939	0.892	
Calibrator Level 6 170 ng/mL	2.682 2.647	2.665	2.618	
Control 1	0.076 0.074	0.076	0.029	2.2
Control 2	0.737 0.711	0.724	0.677	42.6



14.2 Якісне вимірювання

	Абсорбція зчитування (450 нм)	Середнє
Негативний контроль	0.049 0.050	0.050
Позитивний контроль	1.332 1.376	1.354

Позитивний cut-off = $1.1 \times (0.050 + 0.10) = 0.165$

Негативний cut-off = $0.9 \times (0.050 + 0.10) = 0.135$

15 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

15.1 Чутливість

Чутливість ІФА Fecal *H. pylori* Ag, як визначено 95% межі достовірності при 16 повторних визначеннях нульового стандарту, становить приблизно 0.165 нг / мл.

15.2 Специфічність

Аналіз не реагує перехресно на такі організми: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, ротавірус та аденовірус.

15.3 Відтворюваність та точність

Точність в аналізі була підтверджена шляхом вимірювання двох зразків в одному аналізі з 12 повторними визначеннями. Точність між аналізами була підтверджена шляхом вимірювання двох зразків у двох примірниках у 12 індивідуальних аналізах.

Зразок	В аналізі		Між аналізами	
	1	2	1	2
Середнє (нг/мл)	13.1	1.8	13.9	1.8
КВ (%)	5.4	2.8	5.9	5.2

15.4 Лінійність

Два (2) зразки стільця розбавляли буфером для зразків і тестували. Результати такі:

Зразки	Спостережувані (нг / мл)	Відновлення (%)
Зразок А	77.4	-
50%	38.1	98.4
25%	17.5	90.4
Зразок В	24.8	-
50%	12.2	98.6
25%	6.3	102.7

15.5 Насичене відновлення

До двох зразків додали калібратори один до одного в однаковому обсязі та аналізували. Результати вказані нижче:

Розведення	Спостережувані (нг/мл)	Відновлення (%)
Зразок А	0.3	-
+Рівень 2: 1.9 нг/мл	1.1	97.2
+Рівень 4: 16.7 нг/мл	7.1	84.2
+Рівень 5: 50 нг/мл	20.9	83.2
Зразок В	0.2	-
+Рівень 2: 1.9 нг/мл	1.0	93.8
+Рівень 4: 16.7 нг/мл	7.0	82.0
+Рівень 5: 50 нг/мл	21.0	83.1

16 ЛІТЕРАТУРА

- Janoff EN, Smith PD, Blaser MJ. Acute antibody responses to *H. Pylori* are depressed in patients with AIDS J Infect Dis. 1988 Apr;157(4):798-804.
- Rosenblatt JE, Sloan LM, Schneider SK. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *H. Pylori* in stool specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 1993 May-Jun;16(4):337-41.
- Stibbs HH, Samadpour M, Manning JF. Enzyme immunoassay for detection of *H. Pylori* cyst antigens in formalin- fixed and unfixed human stool. J Clin Microbiol. 1988 Sep;26(9):1665-9.
- Stibbs HH. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *H. Pylori* antigen in human stool. J Clin Microbiol. 1989 Nov;27(11):2582-8.
- Ungar BL, Yolken RH, Nash TE, Quinn TC. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *H. Pylori* in fecal specimens. J Infect Dis. 1984 Jan;149(1):90-7.

17 КОРОТКІ ПРОЦЕДУРИ АНАЛІЗУ

1. Кількісне вимірювання

- Додайте 100 мкл калібраторів, контролів та зразків у призначені мікролунки.
- Змішайте, закрийте та інкубуйте **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 60 хвилин.**
- Промити кожну лунку 5 разів.
- Додайте **100 мкл** антитіла-індикатора в кожну лунку.
- Накрити кришкою та інкубувати **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 30 хвилин.**
- Промити кожну лунку 5 разів.
- Додати **100 мкл** субстрату у кожну лунку.
- Накрити кришкою та інкубувати **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 20 хвилин.**
- Додати **100 мкл** стоп-розчин у кожну лунку.
- Зчитайте абсорбцію при **450/620 нм.**

2. Якісне вимірювання

- Додайте 100 мкл позитивного контролю [Калібратор антигену *H. pylori* рівень 6], негативного контролю [розведений 1X буфер для аналізу] та зразки у призначені мікролунки.
- Змішайте, закрийте та інкубуйте **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 60 хвилин.**
- Промити кожну лунку 5 разів.
- Додайте **100 мкл** антитіла-індикатора в кожну лунку.
- Накрити кришкою та інкубувати **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 30 хвилин.**
- Промити кожну лунку 5 разів.
- Додати **100 мкл** субстрату у кожну лунку.
- Накрити кришкою та інкубувати **при кімнатній температурі (20 ° C - 25 ° C) протягом 20 хвилин.**
- Додати **100 мкл** стоп-розчин у кожну лунку.
- Зчитайте абсорбцію при **450 нм.**



ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



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

