

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНУ HELICOBACTER PYLORI

HP Ag

Кат. №: **HPAG.CE**

Дата випуску інструкції: **02-2020**
Версія: **0**



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 антигену Helicobacter pylori в калі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для одноетапного якісного/кількісного визначення антигену Helicobacter pylori (HP Ag) у калі людини. Набір можна використовувати для спостереження за пацієнтами, інфікованими HP, та їх фармакологічного лікування. Тільки для діагностики in vitro.

В. ВСТУП

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

Ця бактерія широко поширена серед людей, без обмежень по статі та віку; було встановлено, що інфекції можуть передаватися безпосередньо при контакті із зараженими біологічними рідинами (слина, стілець, виділення організму), а також із зараженою їжею та напоями.

H.Pylori, і зокрема деякі патогенні штами (CagA+), є етіологічним агентом, що викликає більшість активних інфекцій і ураження слизової оболонки шлунка у людини.

Інфекція H.Pylori, крім того, діє як кофактор у розвитку пухлинних патологій шлункового апарату і, як підозрюють, пов'язана з деякими запальними патологіями статевого апарату жінки, що розвиваються в бік неопластичної трансформації.

В даний час ідентифікація Helicobacter pylori здебільшого проводиться інвазивними гістохімічними методами з визначенням її уреазної активності на ізотопному субстраті (дихальний тест і мас-аналіз), за допомогою трудомістких бактеріологічних культуральних систем і дорогих методів молекулярної біології (ПЛР).

ІФА на HP Ag був представлений лише нещодавно як специфічний, швидкий, неінвазивний (аналіз калу) і дешевший метод виявлення.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Кал пацієнтів використовують як джерело зразка для визначення антигену HP.

Мікропланшети покриті коктейлем афінно очищених моноклональних антитіл мишей, спрямованих на найбільш специфічні антигени Helicobacter pylori.

У 1-й інкубації тверду фазу обробляють зразком, попередньо екстрагованим з калових мас, і одночасно сумішшю моноклональних антитіл до HP, кон'югованих з пероксидазою (HRP).

Після вимивання всіх інших компонентів зразка під час 2-ї інкубації зв'язаний фермент, специфічно присутній на твердій фазі, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антигенів H.Pylori, присутніх у зразку.

Д. КОМПОНЕНТИ

Код HPAG.CE.96 містить реагенти для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 мікролунок, покритих очищеними мишачими моноклональними антитілами, специфічними до HP Ag. Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Калібрувальний набір: CAL ...

x1 набір з 4 флаконів - Ліофілізовані калібратори. Розчинити водою класу EIA. Після розчинення калібратори мають такі концентрації: **0 – 0.1 – 0.5 – 1.0 мкг/мл (µg/ml) HP Ag.**

Вони містять фетальну бичачу сироватку, інактивований HP Ag, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4+/-0.1, 0.02% гентаміцин сульфат і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Важлива примітка: Калібратори в розчиненні не стабільні. Дійте так, як описано у відповідному розділі для зберігання.

3. 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.

4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому мишачі моноклональні антитіла до HP Ag, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

5. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x25 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 0.03% тетра-метил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

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

6. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Буферний розчин для екстракції HP Ag із зразка та підготовки зразка. Містить 10 мМ (mM) Tris-HCl буфер pH 7.4 +/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфат як консерванти.

Компонент кодується синім кольором.

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. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

9. Вкладиш інструкції x 1 шт.

За запитом:

Набір для екстракції HP Ag x 1

Набір містить все необхідне для приготування 50 зразків, екстрагованих із калу, зібраного пацієнтами.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Мікропіпетки з каліброваним змінним об'ємом від 1000 мкл (µl) і до 200 мкл (µl); 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).
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.
9. Одноразовий пластиковий контейнер для збору калу з мікроложкою (доступний за запитом у Dia.Pro s.r.l.).

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.

- 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 піддавайте Хромоген/Субстрат дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
- Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
- Ставтеся до всіх зразків як до потенційно інфекційних відповідно до національних правил і законів, що стосуються поводження з біологічними зразками та їх відходами.
- Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
- 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.
- 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.
- Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
- 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.

G. ЗРАЗКИ: ЗАБІР, ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

- Рекомендується збирати свіжі випорожнення вранці за допомогою пластикового колектора, який надається за запитом разом з набором. В якості альтернативи можна використовувати одноразову пробірку з конічним дном, яку лабораторія надає пацієнту.
- Пацієнт, зразок якого аналізується, не повинен отримувати антибіотик або антибактеріальну терапію, оскільки відомо, що ця фармацевтична терапія впливає на H.pylori до певної міри, залежно від використовуваного антибіотика, що дає підставу для хибної інтерпретації.
- Пацієнту необхідно попросити взяти зразок, уникаючи будь-якого можливого контакту з сечею або водою, використовуючи пластикову ложку, яка є в колекторі калу, і взяти тільки кількість зразка, необхідну для заповнення порожнини ложки.
- Пацієнт повинен доставити зразок того ж дня в лабораторію. З моменту забору зразок можна зберігати в лабораторії до 24 годин при температурі 2...8 °C (°C) або зберігати в замороженому вигляді при -20 °C (°C) протягом тривалого часу.
- Зразки, отримані з калу, повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Маркування штрих-кодом та електронне зчитування

рекомендується, коли кількість зразків при тестуванні досить велика.

Важлива примітка: Деградація антигену HP значною мірою відбувається в калі через 24 години, що дає хибнонегативні результати, навіть якщо зразок зберігається при 2...8 °C (°C).

Наступні операції описані та представлені на малюнках в Інструкції з використання набору для екстракції зразка калу, що надається разом із комплектом.

Працюйте відповідно до наступних інструкцій:

- Відкрийте пристрій для збору калу і глибоко введіть щітку для екстракції у зразок. Оберніть щітку 2-4 рази, щоб зібрати потрібну кількість біологічного матеріалу (близько 0.2 г (g)).
- Обережно перенесіть щітку у пробірку, що входить до набору, а потім додайте 1 мл (ml) Розчинника для зразків. Тримуючи щітку всередині пробірки, енергійно перемішайте на вортексі протягом 1 хв +/-10%, щоб розчинити H.pylori в розчині.
- Викиньте щітку та вставте фільтруючий поршень, що входить до набору, у пробірку. Обережно втисніть поршень вниз у пробірку, щоб зібрати не більше 150-200 мкл (µl) рідкої фази суспензії, об'єму достатнього для проведення випробування.

Важливі примітки:

- Будьте обережні, щоб не чинити занадто сильний ручний тиск на поршень. Поршень може зламати пробірку, і можуть виникнути розливи. Якщо це сталося, скористайтеся паперовим рушником, змоченим лікарняним дезінфікуючим засобом, щоб очистити забруднені поверхні.
- Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків, особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату, створюючи хибнонегативні результати.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на істотну втрату активності до 6 повторних використань пристрою та терміном до 3 місяців.

Мікропланшети:

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. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C).

Важливе зауваження: При першому відкритті смужки, що залишилися, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Калібрувальний набір:

Додайте об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці, до лioфілізованого порошку кожного Калібратора. Дайте вмісту повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Калібратори після розчинення не стабільні. Зберігати замороженими у вигляді аликвот при -20 °C (°C), промарковані вмістом HP Ag, присутнім у кожному з них.

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.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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 Н-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні Р-фрази:

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

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКИРУ: 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 (70% етанол, 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%.

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 М (М) NaOH).

5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (µl/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 помилково позитивних реакцій. Перед використанням набору для звичайних лабораторних тестів вошер необхідно правильно оптимізувати за допомогою контролів/калібратора та референсних панелей.

Важлива примітка: Через характер використовуваного зразка та можливу присутність частинок у зразку, стежте за тим, щоб голки вошера не заблокувалися через наявність частинок зразка.

4. Час інкубації має допуск +/- 5%.

5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (а) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) 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. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

Важлива примітка: Через характер використовуваного зразка та можливу присутність частинок у зразку, слідкуйте за тим, щоб голки робочої станції не заблокувалися через наявність частинок зразка. Ми наполегливо рекомендуємо використовувати одноразові наконечники для зразків, щоб уникнути блокування або пошкодження фіксованих зондів.

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.

8. За запитом Dia.Pro srl пропонує пристрій для підготовки зразків, здатний підготувати зразок без частинок, що демонструє чудові результати аналізу. Будь ласка, надсилайте запити.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Приготуйте зразок калу, як описано в розділі G і представлено в Інструкції з використання Набору для екстракції HP Ag.
2. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки набору. Не використовуйте, якщо термін придатності закінчився.
3. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
4. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
5. Розчиніть Набір калібраторів, як описано вище.
6. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте як описано.
7. 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.
8. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
9. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
10. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
11. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
12. 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.

Доступні дві процедури: кількісний метод, здатний забезпечити кількісне визначення HP Ag у зразку, і якісний метод.

А. Кількісне визначення:

1. Помістіть потрібну кількість смужок у пластиковий тримач і ретельно ідентифікуйте лунки для калібраторів і зразків. Залиште лунки А1+В1 порожніми для операції бланкування.
2. Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) калібраторів у двох примірниках у калібрувальні лунки (див. приклад дозування, наведений нижче).
3. За допомогою піпетки Пастера, яка постачається, відфільтруйте рідину у внутрішню камеру поршня і внесіть 2 краплі (близько 100 мкл (μl)) зразка в лунку для зразка. Перевірте наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця в кольорі між порожньою та повною лункою) або зчитуванням при 450/620 нм (nm) (зразки показують значення OD вище 0.100).
4. Потім внесіть 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату у всі лунки, за винятком А1+В1, які використовуються для бланкування.

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

5. Після додавання кон'югату перевірте, чи колір зразків перетворився з коричневого на блідо-червоний, і інкубуйте мікропланшет протягом **120 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливі примітки: Смужки повинні бути заклені клейкою герметизуючою фольгою тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання робочих станцій ІФА.

6. Коли перша інкубація закінчиться, промийте мікролунки, як описано раніше (розділ І.3).
7. Піпетуйте 200 мкл (μl) Хромогену/Субстрату в усі лунки, включаючи А1+В1. Інкубуйте мікропланшет, захищений від світла, при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**.

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

8. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 6.
9. 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.

Нижче наведено приклад схеми видачі:

Мікропланшет						
	1	2	3	4	5	6
A	BLK	CAL4				
B	BLK	CAL4				
C	CAL1	S 1				
D	CAL1	S 2				
E	CAL2	S 3				
F	CAL2	S 4				
G	CAL3	S 5				
H	CAL3	S 6				

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок

В. Якісне визначення:

1. Помістіть потрібну кількість смужок у пластиковий тримач і ретельно ідентифікуйте лунки для калібраторів і зразків. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
2. Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Калібратора 1 у двох примірниках, 100 мкл (μl) Калібратора 2 у двох примірниках, 100 мкл (μl) Калібратора 4 в одиничних і потім 100 мкл (μl) зразків. Перевірте наявність зразків у лунках, як повідомлялося раніше.
3. Внесіть 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату у всі лунки, за винятком А1, яка використовується для бланкування.

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

4. Після додавання кон'югату перевірте, чи колір зразків перетворився з коричневого на блідо-червоний, і інкубуйте мікропланшет протягом **120 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливі примітки: Смужки повинні бути заклені клейкою герметизуючою фольгою тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання робочих станцій ІФА.

5. Коли перша інкубація закінчиться, промийте мікролунки, як описано раніше (розділ І.3).
6. Піпетуйте 200 мкл (μl) Хромогену/Субстрату в усі лунки, включаючи А1. Інкубуйте мікропланшет, захищений від світла, при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**.

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

7. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 6.
8. 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.

Нижче наведено приклад схеми видачі:

Мікропланшет						
	1	2	3	4	5	6
A	BLK	S 3				
B	CAL1	S 4				
C	CAL1	S 5				
D	CAL2	S 6				
E	CAL2	S 7				
F	CAL4	S 8				
G	S 1	S 9				
H	S 2	S 10				

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор S = Зразок

Важливі загальні зауваження:

1. Перед зчитуванням переконайтеся, що на зовнішньому дні мікролунки немає відбитків пальців або пилу. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. 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

Операції	Процедура
Калібратори та Зразки	100 мкл (μl)
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
1-а інкубація	120 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
2-а інкубація	20 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка проводиться на контролях/калібраторі кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи очікувані значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) або S/Co аналізу є відповідними. Переконайтеся, що досягнуто наступних результатів:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення OD450 нм (nm)
CAL 0 мкг/мл (μg/ml)	< 0.200 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування
CAL 0.1 мкг/мл (μg/ml)	OD450 нм (nm) > OD450 нм (nm) CAL 0 мкг/мл (μg/ml) + 0.100
CAL 1 мкг/мл (μg/ml)	> 1.000 значення OD450 нм (nm)

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
CAL 0 мкг/мл (µg/ml) > 0.200 OD450 нм (nm) після бланкування	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошера був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивних калібраторів 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.
CAL 0.1 мкг/мл (µg/ml) OD450 нм (nm) < CAL 0 мкг/мл (µg/ml) + 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.
CAL 1 мкг/мл (µg/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.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі М, пункти А8 та В8.

Р. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Кількісний аналіз:

Обчисліть середнє значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для калібраторів. Потім намалюйте калібрувальну криву, можливо, використовуючи систему побудови кривої з 4 параметрами. Потім розрахуйте на кривій концентрацію антигену НР у зразку.

Якісний аналіз:

Результати тесту розраховуються за допомогою граничного значення, визначеного на основі значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) CAL 0 мкг/мл (µg/ml) (CAL 0) і OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) CAL 0.1 мкг/мл (µg/ml) (CAL 0.1) за такою формулою:

$$\text{Cut-off} = (\text{CAL 0} + \text{CAL 0.1}) / 2$$

Важлива примітка: Якщо обчислення результатів виконується операційною системою автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для розрахунку граничного значення та правильної інтерпретації результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У кількісному аналізі зразки з концентрацією антигену Н. pylori вище 0.05 мкг/мл (µg/ml) вважаються позитивними.

Для якісного аналізу результати випробувань інтерпретуються як відношення зразка OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) (S) і граничного значення Cut-off (Co), математично S/Co, відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 - 1.1	Двозначний
> 1.1	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не інфікований Н. pylori.

Будь-якого пацієнта, який показує неоднозначний результат, слід повторно перевірити на другому зразку.

Позитивний результат вказує на інфекцію НР, тому пацієнта слід лікувати відповідно.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений спочатку повторним тестом, а потім, якщо він все ще позитивний, альтернативним методом до підтвердження діагнозу НР-інфекції.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз НР-інфекції має поставити та передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією. Це слід робити також з урахуванням інших діагностичних ознак інфекції.

Нижче наведено приклад якісного методу (дані отримані як крок читання, описаний у розділі М, пункт В8):

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

Калібратор 0 мкг/мл (µg/ml): 0.040 – 0.060 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.050 OD450 нм (nm)
Нижче 0.200 - Приймається

Калібратор 0.1 мкг/мл (µg/ml): 0.210 – 0.230 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.220 OD450 нм (nm)
Вищий, ніж CAL 0 мкг/мл (µg/ml) + 0.100 - Приймається
Cut-Off = (CAL 0 + CAL 0.1) / 2 = 0.135

Калібратор 1 мкг/мл (µg/ml): 2.000 OD450 нм (nm)
OD450 нм (nm) вище 1.000 - Приймається

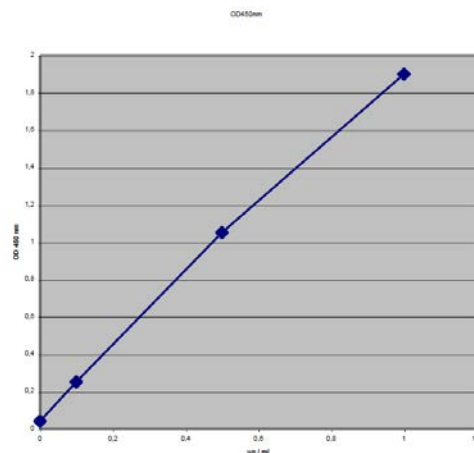
Зразок 1: 0.028 OD450 нм (nm)

Зразок 2: 1.690 OD450 нм (nm)

Зразок 1 S/Co < 1.0 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

Приклад калібрувальної кривої наведено нижче:



R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності проводилася шляхом тестування негативних і позитивних зразків у зовнішньому клінічному центрі, а також у власних лабораторіях.

1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу була розрахована шляхом дослідження серійного розведення антигену HP у Розчиннику зразка.

Результати показують, що аналітична чутливість є кращою за **0.05 мкг/мл (µg/ml)**, коли межа розведення приймається як середнє OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) CAL 0 мкг/мл (µg/ml) + 5 SD.

2. Діагностичні показники:

Діагностичні характеристики набору були вивчені в деяких зовнішніх випробуваннях проти (а) «дихального тесту», який в медичній літературі вважається Золотим Стандартом визначення HP Ag, і (б) також проти комерційного ІФА з маркуванням SE.

У дослідженнях, в яких використовувався «дихальний тест» як референсний, кал збирали у пацієнтів в той же день, що і проведення «дихального тесту».

У дослідженні, проведеному з використанням комерційного ІФА як референсного, ті самі зразки були екстраговані за допомогою спеціального пристрою, який постачався в наборі.

У дослідженнях, проведених щодо дихального тесту, наступні середні значення були отримані з двох центрів, одного в Італії та одного в Іспанії:

- Чутливість: 98%
- Специфічність: 96%

Не було можливого підтвердження методом ІФА на невідповідних зразках.

У дослідженнях, проведених з посиланням на комерційний ІФА з маркуванням SE, аналогічним чином на основі моноклональних антитіл до *H.pylori*, були отримані такі середні значення:

- Чутливість: 100%
- Специфічність: 93%

Невідповідні зразки (7% «хибнопозитивних») виявилися позитивними в дихальному тесті, що показує кращу загальну продуктивність нашого набору порівняно з комерційним референсним у порівнянні з методом золотого стандарту.

Через найвищу специфічність моноклональних антитіл, використаних у наборі, не спостерігалось перехресної реакції з видами *Campylobacter*.

3. Точність:

Варіабельність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразків. Спостерігалися значення CV в діапазоні 4-8%, залежно від значень OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

S. ОБМЕЖЕННЯ

Помилково негативні результати були отримані із екстрагованих зразків, які зберігалися більше 1 доби при 2..8 °C (°C). Цей висновок пояснює те, що пристрій виявляє «живий» *H.pylori*, що підтверджується результатами відмінного порівняння з дихальним тестом.

Хибнопозитивні результати в основному були отримані із зразків рідкого калу, які важко обробляти та екстрагувати.

ГРАФІЧНА СХЕМА АНАЛІЗУ

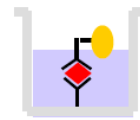
Додайте 100 мкл (µl) Калібраторів, зразків і кон'югату в планшет, а потім інкубуйте протягом 120 хвилин при +37 °C (°C)



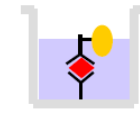
Промийте, як описано у відповідному розділі



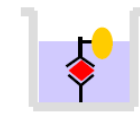
Додайте 200 мкл (µl) Хромогену/Субстрату та інкубуйте 20 хвилин при кімнатній температурі



Додайте 100 мкл (µl) Сірчаної Кислоти



Зчитайте пластину при 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (бланкування)



ЛІТЕРАТУРА

- Fujisawa T. et al. J Clin Lab Anal. 2001; 15(3):154-9
Braden B. et al. Ann Med. 2001 Mar; 33(2):91-7
Dominguez-Bella MG. Et al. FEMS Microbiol Lett. 2001 Apr 20;198(1):15-6
Ding HJ. Et al. J Gastroenterol. 2001 Apr; 36(4):237-41
Monteiro L. et al. J Microbiol Methods. 2001 Jun; 45(2):89-94
Kim N. et al. Korean J Intern Med. 2000 Dec; 15(3):187-94
Monteiro L. et al. Am J Gastroenterol. 2001 Feb; 96(2):353-8
Shimada T. et al. Nippon Rinsho. 2001 Feb; 59(2):280-5
Brown LM. Epidemiol Rev. 2000; 22(2):283-97
Ameriso SF. Et al. Stroke 2001 Feb; 32(2):385-91
Vaira D. et al. Aliment Pharmacol Ther. 2000 Oct; 14 suppl (3):13-22

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 s.r.l.
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

