



Набор ИФА для определения антител класса IgG к инфекции H.Pylori

Кат. номер : 1503Z
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 16-11-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Анализ	H.pylori IgG ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	10 мкл сыворотки
Специфичность	98,1 %
Чувствительность	98,5 %
Общее время	~ 60 мин.
Срок годности	12-18 мес.

НАЗВАНИЕ И ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор Helicobacter pylori IgG компании ДАИ предназначен для определения серологического статуса к инфекции H.pylori в пациентов при желудочно-кишечных симптомах. Только для диагностического использования in vitro. Анализ высокой сложности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Helicobacter pylori является спиральной бактерией, выделенной из слизистой оболочки желудка человека Маршалом в 1982 г. Изучения указывают, что присутствие H.pylori ассоциируется с разными желудочно-кишечными заболеваниями, как гастрит, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, не-язвенная диспепсия, гастро аденокарцинома и лимфома. Организм присутствует в 95-98% пациентов с язвой двенадцатиперстной кишки и 60-90% пациентов с язвой желудка. Изучения также показывают, что выделение организма антимикробной терапией соотносится с прекращением симптомов и лечением заболевания.

Пациенты с клиническими симптомами, что относятся к желудочно-кишечному тракту, могут диагностироваться на инфекцию H.pylori двумя методами: инвазивной методикой, включая биопсию, после изучения культуры или гистологического изучения образцов биопсии или прямого определения активности уреазы; неинвазивной методикой, что включает исследование мочи и серологические методы.

Все исследования, что проводятся на образцах биопсии, могут быть ошибочными через сбор образцов и влияние загрязненными бактериями. Данный исследование предоставляет исследование присутствия H.pylori специфического IgG антитела серологическим методом, через его точность и простоту.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген H.pylori, привитый к поверхности микролунок. Разбавленная сыворотка пациента добавляется в лунки и специфическое антитело H.pylori IgG, если оно присутствует, связывается с антигеном. Все несвязанные материалы вымываются. После добавления ферментного конъюгата, он связывается с комплексом антитело-антиген. Остатки ферментного конъюгата вымываются, и добавляется ТМ хромогенный субстрат. Каталитическая реакция останавливается в специфическое время. Интенсивность вырабатываемого цвета пропорциональна количеству специфического IgG антитела в образце. Результаты считываются микропланшетным считывателем и сравниваются с калибратором и контролями.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Обращайтесь с кровью и сывороткой как с потенциально инфицированными.
2. Оптимальное проведение данного исследования зависит от использования свежих образцов сыворотки (чистой, не

- гемолизированной, не липемической, не иктерической). Минимальный объем сыворотки рекомендуется 50 мкл, поскольку необходимо повторение исследования. Образцы следует собрать асептической венопункцией. Быстрое отделение от ступок минимизирует гемолиз сыворотки.
3. Хранить сыворотку при 2-8°C если исследование и хранение будет проводиться в течении двух дней. Если образцы будут храниться дольше, храните при -20°C или ниже. Не используйте саморазмораживающую систему. Образцы, что хранились не должным образом или подверглись многочисленным циклам замораживания / размораживания, могут давать ошибочные результаты.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Каждый набор содержит точное количество компонентов, необходимое для числа анализов, указанное на этикетке.

1. **Антиген H.pylori**, привитый к микропланшету: 96 лунок, разделен на 12 1x8 полосок, хранящиеся в фольговом пакете с осушителем – **96Т: 1 планшет; 480Т: 5 планшетов.**
2. **Разбавитель сыворотки тип I:** готовый к использованию. Содержит проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут. 30 мл; 96Т: 2 бут. 60 мл.**
3. **Пороговый (cut-off) калибратор:** человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, со специфическим фактором набора, указанном на наборе. Калибратор используется для калибровки анализа для вычисления между дневного колебания температуры и других условий исследования – **96Т: 1 фл., 0,4 мл; 480Т: 1 фл., 0,8 мл*.**
4. **Высоко положительный контроль:** человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на наборе. – **96Т: 1 фл., 0,4 мл; 480Т: 1 фл., 0,8 мл*.**
5. **Низко положительный контроль:** человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на наборе. – **96Т: 1 фл., 0,4 мл; 480Т: 1 фл., 0,8 мл*.**
6. **Отрицательный контроль:** человеческая сыворотка. Азид натрия (0,1%) и pen/strep (0,01%) добавлены в качестве консерванта, с установленным диапазоном, указанным на этикетке – **96Т: 1 фл., 0,4 мл; 480Т: 1 фл., 0,8 мл*.**
- *Примечание: флакон сыворотки может содержать лишний объем.
7. **Конъюгат пероксидазы хрена:** готовый к использованию. Козлиный анти-человеческий IgG, содержащий проклин (0,1%) и гентамицин в качестве консерванта. – **96Т: 1 бут., 16 мл; 480Т: 5 бут. 16 мл.**
8. **Раствор хромогена/субстрата тип I:** ТМВ, готовый к использованию. При хранении при 2-8°C, раствор стабильный до окончания срока пригодности. Реагент следует сохранять закрытым. При испарении, может формироваться осад в лунках с реагентом – **96Т: 1 бут., 15 мл; 480Т: 5 бут. 15 мл.**
9. **Промывочный буфер тип I (20X концентрат):** разбавьте 1 часть концентрата + 19 частей деионизированной или дистиллированной воды. Содержит TBS, Tween и проклин (0,1%) в качестве консерванта – **96Т: 1 бут., 50 мл; ; 480Т: 1 бут. 250 мл.**
10. **Стоп раствор:** готовый к использованию, содержит раствор 1N H₂SO₄ – **96Т: 1 бут. 15 мл; 480Т: 5 бут. 15 мл.**

*Примечание: флаконы с сывороткой могут содержать больший объем.

Следующие компоненты не зависят от серии набора и могут использоваться взаимозаменяемо с наборами ИФА Trinity Biotech ELISA IgA: разбавитель сыворотки тип I, раствор хромоген / субстрата типа I, промывочный буфер тип I и стоп раствор. Проверьте использование соответствующего типа реагентов Trinity Biotech (тип I, тип II и т.п.).

ДОПОЛНИТЕЛЬНО ТРЕБУЮТСЯ

1. Мерная колба (100 мл).
2. Колба (1л).
3. Таймер 0-60 минут.
4. Микропипетки способностью точного распределения объема 10-200 мкл (КВ меньше чем 3%).
5. Деионизированная или дистиллированная вода.
6. Бумажные полотенца.
7. Бутылка для промывания, полуавтоматическое или автоматическое устройство для промывания.
8. Микропланшетный считыватель с одной или двойной длиной волны при фильтре 450 нм. Если используется двойная длина волны, установите фильтр 600-650 нм. Установите линейную спецификацию ридера согласно руководству по эксплуатации.
9. Исследовательские пробирки для разбавления сыворотки.
10. Резервуар для уничтожения и дезинфекции (напр. 0,5% гипохлорид натрия).

Примечание: используйте только чистую, сухую стеклянную посуду.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Храните невскрытый набор при 2-8⁰С. Набор для исследования может использоваться до окончания срока пригодности, указанном на этикетке набора.
2. Невскрытый микропланшет необходимо хранить при 2-8⁰С. Неиспользованные полоски необходимо немедленно поместить в запечатанный пакет с осушителем и индикатор влаги и хранить при 2-8⁰С.
3. Хранить HRP-конъюгат при 2-8⁰С.
4. Хранить пороговый калибратор, высоко положительный низко положительный контроль, отрицательный контроль при 2-8⁰С.
5. Храните разбавитель сыворотки, субстратный буфер и 20X промывочный буфер при 2-8⁰С.
6. Хранить раствор хромогена/субстрата при 2-8⁰С.
7. Храните 1X (разбавленный) промывочный буфер при комнатной температуре (21-25⁰С) до 5 дней или 1 неделю при 2-8⁰С.

Примечание: Если сохранить температуру хранения стабильной, реагенты и субстрат будет стабильный до окончания срока пригодности. Смотрите дату, указанную на этикетке набора. При приготовлении реагентов следует придерживаться необходимых мер предосторожности для защиты реагентов от загрязнения и от бактериологических агентов. Защищайте реагенты этого набора от загрязнения.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Только для диагностики in vitro.
2. Обращайтесь со всеми реагентами и образцами как с потенциально инфицированными. Компоненты этого набора исследованы и контролируются на соответствие серии набора. Не смешивайте компоненты разных серий, кроме раствора хромоген / субстрата, стоп раствора и промывочного буфера. Разбавитель образцов типа I может использоваться с другими IgG наборами. Не смешивайте компоненты разных изготовителей.
3. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности.
4. Все реагенты необходимо привести к комнатной температуре (21-25⁰) до начала исследования. Забирайте только необходимый объем реагентов. Не вливайте реагенты обратно во флакон, поскольку может происходить загрязнение.
5. Перед вскрытием флаконов калибратора и контроля, постучите по крышке, чтобы вся жидкость была на дне флакона.
6. Используйте только дистиллированную или деионизированную воду и чистую посуду.
7. Не давайте возможности ячейкам высохнуть; добавляйте реагенты немедленно после окончания шага промывания.
8. Избегайте перекрестного загрязнения реагентов. Мойте руки до и после работы с реагентами.
9. При ручном промывании лунки необходимо промывать три раза. При автоматическом промывании необходимо промывать пять раз.
10. Азид натрия подавляет активность конъюгата. Необходимы чистые наконечники для добавления конъюгата, чтобы азид натрия не попадал от других реагентов.
11. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью и формировать взрывоопасные вещества. При попадании, промойте большим количеством воды.
12. Не пипетируйте ртом и избегайте попадания реагентов и сыворотки пациента на кожу.
13. Если используется раствор гипохлорида (отбеливатель) в качестве дезинфицирующего вещества, избегайте попадания на рабочую поверхность, поскольку, существует возможность влияния на активность энзима.
14. Избегайте контакта стоп раствора с кожей и глазами. В случае попадания, промойте большим количеством воды.
15. **Внимание:** жидкие отходы при кислоте pH необходимо нейтрализовать до добавления их в раствор гипохлорида (отбеливатель) для избегания формирования ядовитых газов.
16. Концентрации анти-H.pylori в определенном образце, определяемые наборами анализов от разных производителей могут отличаться исходя из отличий в методике анализа и специфичности реагентов.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МЕТОДИКИ

Подготовка к анализу:

1. Все реагенты следует вынуть из холодильника и привести к комнатной температуре перед использованием (21-25⁰С).

Поместите все реагенты в холодильник сразу после использования.

2. Все образцы и контроли следует перемешать перед использованием.
3. Разбавьте 60 мл 20X промывочного буфера тип I до 1,2 л дистиллированной или/и деионизированной водой. Хорошо перемешайте.

Процедура анализа

1. Вставьте необходимое количество полосок в рамку для микропланшета. Используйте в одной процедуре шесть (6) определений для контролей и порогового калибратора (один отрицательный контроль, три пороговых калибратора, один высоко положительный контроль и один низко положительный контроль). Реагент бланк (РБ) необходимо использовать в каждом анализе. Проверьте требования ПО и ридера для правильной конфигурации контроля/калибратора. Поместите неиспользованные полоски в запечатанный пакет с осушителем и индикатором влаги, запечатайте и немедленно поместите в холодное место.

Пример конфигурации:

1A	RB	2A	Пациент 2
1B	NC	2B	Пациент 3
1C	Cal	2C	Пациент 4
1D	Cal	2D	Пациент 5
1E	Cal	2E	Пациент 6
1F	HPC	2F	Пациент 7
1G	LPC	2G	Пациент 8
1H	Пациент 1	2H	Пациент 9

RB – Реагент бланка – ячейка без сыворотки со всеми реагентами. Используется для бланка ридера

NC – Отрицательный контроль

Cal – калибратор

HPC - высоко положительный контроль

LPC - низко положительный контроль

2. Разбавьте разбавителем сыворотки исследуемые сыворотки, пороговый калибратор и контрольные сыворотки 1:21 (напр., 10 мкл + 200 мкл). (При ручном разбавлении предлагается вносить сначала разбавитель сыворотки в исследуемую пробирку, а потом добавить сыворотку пациента).
3. В отдельные лунки внести 100 мкл соответствующим образом разбавленного порогового калибратора, контролей и сывороток пациентов. Добавить 100 мкл разбавителя сыворотки в лунку для бланка реагента (A-1). Проверьте требования ПО и ридера для конфигурации лунки реагента бланка.
4. Инкубировать каждую лунку при комнатной температуре (21-25⁰С) 25 минут +/- 5 минуты.
5. Аспирировать или вытряхнуть жидкость со всех лунок. При использовании полуавтоматического или автоматического устройства для промывания, добавьте 250-300 мкл разбавленного промывочного буфера. Аспирируйте или вытряхните и переверните планшет вверх дном на бумажное полотенце для удаления всей жидкости. Повторите процедуру промывания 2 раза (для общего числа промывания 3) для ручного или полу автоматического промывания или четыре раза (для общего числа 5 промываний) для автоматического промывания. После окончательного промывания, промокните планшет на бумажное полотенце для удаления всей жидкости из лунок.

Важное примечание: Относительно шагов 5-8 – недостаточное или излишнее промывание влияет на результаты анализа. Поэтому, рекомендуется использовать полу-автоматическое или автоматическое промывание для полного заполнения каждой лунки (250-300 мкл). Всего необходимо пять промываний при автоматической процедуре. Полностью удаляйте промывочный буфер после последнего промывания, поскольку, это имеет критическое значение для точности выполнения анализа. Также визуально удостоверьтесь, что в лунках не было пузырей.

6. Добавьте 100 мкл конъюгата в каждую лунку, включая лунку реагента бланка (A-1). Избегайте пузырей при добавлении, так как они могут провоцировать ошибочные результаты.
7. Инкубируйте каждую лунку 25±5 минуты при комнатной температуре (21-25⁰С).
8. Повторите промывание как описано в этапе 5.
9. Добавьте 100 мкл раствора хромоген / субстрата в каждую лунку, включая лунку реагента бланка (A-1), соблюдайте одинаковый порядок добавления в лунки планшета.
10. Инкубируйте 10-15 минуты при комнатной температуре (21-25⁰С).
11. Остановите реакцию добавлением 100 мкл стоп раствора, придерживаясь того же порядка, что и при добавлении

хромогена / субстрата, включая лунку реагента бланка (А-1). Легко постучите по внешней стороне планшета для смешивания всех компонентов лунок. Подождите минимум 5 минут и считайте. Считывать можно на протяжении одного часа после добавления стоп раствора.

- Окрас, что образовался, необходимо считать планшетным считывателем ИФА при 450 нм. Если используется двойная волна, установите фильтр при 600-650 нм. Прибор необходимо настроить относительно воздуха. Реагент бланка должен быть меньше, чем 0,150 абсорбции при 450 нм. Если реагент бланка $\geq 0,150$, исследование необходимо повторить. Настройте считыватель согласно реагенту бланка и продолжайте считывать всю лунку. Уничтожьте использованный планшет после считывания.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Чтоб анализ принимался как достоверный, необходимо выполнение следующих условий.

- Пороговый калибратор и контроли должны использоваться в каждой процедуре анализа.
- Реагент бланка (при считывании относительно воздуха) должен быть $< 0,150$ абсорбции (А) при 450 нм.
- Отрицательный контроль должен быть $< 0,250$ А при 450 нм (при считывании относительно реагента бланка).
- Каждый пороговый калибратор должен быть $\geq 0,250$ А при 450 нм (при считывании относительно бланк реагента).
- Высоко положительный контроль должен быть $\geq 0,500$ А при 450 нм (при считывании относительно реагента бланка).
- Значение ISR (коэффициент иммунного статуса) для положительного и отрицательного контроля должны быть в своих соответствующих границах, указанных на флаконах. Если значения контролей не соответствуют диапазону, исследование необходимо повторить.
- Дополнительные контроли должны исследоваться соответственно указаниям или требованиям местных, государственных и/или федеральных организаций, что занимаются урегулированием данных вопросов.
- Если данные критерии не выполняются при повторении исследования, обратитесь к производителю.

ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

- Значение порогового калибратора. Вычислите среднее значение для порогового калибратора исходя из трех его определений. Если любое из трех значений порогового калибратора отличается более чем на 15% от среднего, отклоните это значение и вычислите среднее из двух остальных значений.
- Поправочный коэффициент – для отчета ежедневных отклонений в работе анализа, относящихся к комнатной температуре и времени. Поправочный коэффициент определяется компанией-производителем для каждой партии наборов. Поправочный коэффициент печатается на флаконе калибратора.
- Значение ОП порогового калибратора для каждого анализа определяется умножением поправочного коэффициента на среднее значение порогового калибратора, определяемое в п. 1.
- Вычислите значение коэффициента иммунного статуса (ISR) каждого образца разделив значение ОП образца на ОП порогового значения. Определение значений указано в п. 3.

Пример:

ОП порогового калибратора = 0,38, 0,40, 0,42
 Средняя ОП порогового калибратора = 0,40
 Поправочный коэффициент = 0,50
 Пороговое значение ОП = $0,50 \times 0,40 = 0,20$
 ОП сывороток пациентов = 0,60
 Коэффициент иммунного статуса = $0,60/0,20 = 3,00$

АНАЛИЗ

- ISR пациента интерпретируется и представляется следующим образом:

ISR	Результаты	Интерпретация
$\leq 0,90$	Отрицательный	Определяемый уровень антитела IgG отсутствует.
0,91-1,09	Сомнительный	Образцы, что остаются сомнительными после повторного исследования, должны исследоваться альтернативным методом, напр. иммунофлюоресценцией. Если результат и дальше сомнительный, необходимо взять дополнительные образцы.
$\geq 1,10$	Положительный	Указывает на присутствие определяемого уровня IgG антител.

- Чтобы определить пороговый диапазон этим набором были проанализированы 110 отрицательных сывороток. Отрицательность и положительность, используемые для определения порогового диапазона анализа, были определены другой методикой ИФА. Среднее и стандартное отклонение считываний оптической плотности для сывороток составило 0,131 и 0,109, соответственно. Положительный порог анализа был определен путем суммирования среднего значения и двух стандартных отклонений ($0,131 + 3(0,109) = 0,46$). Положительная сыворотка титровалась, чтобы дать постоянный коэффициент порогового значения и получить пороговое значение сывороточного порогового калибратора. Во всех последовательных анализах, эта сыворотка была использована и анализ откалиброван умножением значения ОП порогового калибратора на коэффициент значения и получить пороговое значение ОП порогового значения. Затем это значение было разделено на ОП сывороток пациента, чтобы получить коэффициент иммунного состояния (ISR). По определению, пороговое значение ISR равно 1.00. Принимая во внимание присущую вариацию в иммунологическом анализе, значение 0.91-1.09 рассматривается как сомнительное. Поэтому, значения ≤ 0.90 считаются отрицательными и значения ≥ 1.10 считаются положительными как коэффициент (ISR).
- Чтобы оценить значительность изменения в уровне антител парных сывороток, оба образца необходимо анализировать в том же анализе. Среднее значение ISR для образца выздоравливающего пациента должно быть > 1.10 , чтобы в парных сыворотках наблюдалось значительное увеличение уровня антител.

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Анализ должен использоваться для оценки пациентов с клиническими симптомами. Предполагаемыми желудочно-кишечными заболеваниями.
- Как и в других серологических анализах, результаты этого анализа должны интерпретироваться совместно с другой клинической информацией.
- Положительный тест не дает возможности установить разницу между острой инфекцией и колонизацией *H.pylori*. Это не обязательно указывает, что желудочно-кишечные заболевания присутствуют.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
 Тел.: (0342) 775122
 Тел/факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua