



ИФА набор для количественного определения IgG антител к *Helicobacter pylori* в человеческой сыворотке

Кат. № : EIA-3057
Количество тестов : 96
Производитель : DRG (США)

Методика от 17-03-2006

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

СХЕМА ПРОЦЕДУРЫ АНАЛИЗА

1. Разбавления образца 1:40

5 мкл / 200 мкл

2. Три инкубации при комнатной температуре

Разбавленный образец	Ферментный Конъюгат	ТМВ реагент (одностадийный)
100 мкл	100 мкл	100 мкл
30 минут	30 минут	20 минут

3. Остановить 100 мкл кислоты. Считать ОП при 450 нм.

ПРИМЕНЕНИЕ

Набор *Helicobacter pylori* IgG количественного определения IgG антител к инфекции *H.pylori* в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

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, гастроаденокарцинома 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:

1. Инвазивные методики - включают биопсию, после изучения культуры или гистологического изучения образцов биопсии или прямого определения активности уреазы;
2. Неинвазивные методики - включают тестирование вывода мочи и серологические методы.

Все тесты, что проводятся на образцах биопсии, могут быть ошибочными через сбор образцов и влияние загрязненными бактериями. Данный тест представляет тестирование присутствия *H.pylori* специфического IgG антитела серологическим методом, через его точность и простоту.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Очищенный антиген *H.pylori*, привитый к поверхности микрочаек. Разбавленная сыворотка пациента добавляется в ячейки 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 ридером и сравниваются с калибратором и контролями.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые в наборе материалы:

- Лунки микропланшета, покрытые очищенным антигеном *H.pylori* (12x8 лунок).
- Ферментный конъюгат (красного цвета), 13 мл.
- Разбавитель образца (зеленого цвета), 22 мл.
- Отрицательный контроль *H.pylori*, < 6,25 Е/мл, 150 мкл.

- Стандарты *H.pylori*: 0, 6.25, 12.5, 25, 50 и 100 Е/мл, 150 мкл каждый.
- Положительный контроль *H.pylori*, > 100 Е/мл, 150 мкл.
- Промывочный буфер (20x), 50 мл.
- ТМВ реагент (одностадийный), 11 мл.
- Стоп раствор (1N HCl), 11 мл.

Необходимые, но не поставляемые материалы:

- Дистиллированная вода.
- Точные пипетки: 5, 100 и 200 мкл.
- Одноразовые наконечники для пипеток.
- Визревой смеситель или аналог.
- Гигроскопичная бумага или бумажное полотенце.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

1. Собрать образцы крови и отделить сыворотку соответствующей методикой. Этот набор предназначен только для использования с образцами сыворотки без консервантов.
2. Образцы можно хранить при 2-8°C не более одной недели или замороженными до 6 месяцев. Избегать повторного замораживания и размораживания образцов.

ХРАНЕНИЕ НАБОРОВ и ИНСТРУМЕНТАРИЯ

1. Невскрытые наборы после получения следует хранить при 2-8°C и микротитровальный планшет необходимо хранить в закрытой упаковке с осушителем, чтобы минимизировать влияние влажного воздуха. Вскрытые наборы остаются стабильными до указанного срока годности, при соблюдении указанных выше условий хранения. Микротитровальный планшетный считыватель с шириной дорожки 10 нм или меньше и диапазоном оптической плотности 0-2 ОП или больше при длине волны 450 нм подходит для использования в измерении абсорбции.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

1. Все реагенты перед использованием нужно привести к комнатной температуре (18-25°C).
2. Развести 1 объем промывочного буфера (20x) с 19 объемами дистиллированной воды. Например, разбавьте 50 мл промывочного буфера (20x) в дистиллированной воде, чтобы приготовить 1000 мл промывочного буфера (1x). Промывочный буфер стабилен в течении 1 месяца при 2-8°C. До использования хорошо перемешайте.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Поместить нужное количество полосок в рамку.
2. Развести образцы разбавителем в соотношении 1:40, все 6 стандартов *H.pylori*, отрицательный контроль, и положительный контроль путем добавления 5 мкл образца к 200 мкл разбавителя образца. Тщательно перемешать.
3. В соответствующие лунки внести по 100 мкл разведенных образцов сыворотки, 6 стандартов и контролей в соответствующие лунки. Для определения фона внести 100 мкл разбавителя образца в лунку 1А. Удалить пузырьки воздуха из жидкости и тщательно перемешивать содержимое лунок в течении 10 сек.
4. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
5. В конце инкубации удалить жидкость из лунок и промыть их 4 раза разбавленным промывочным буфером(1x), и затем 1 раз дистиллированной водой. (Не использовать проточную воду!).
6. Внести в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата, осторожно перемешивать в течении 10 сек.
7. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
8. Удалить ферментный конъюгат из всех лунок и промыть их 4 раза разбавленным промывочным буфером (1x), и затем 1 раз дистиллированной водой.
9. Внести 100 мкл ТМВ реагента в каждую лунку. Осторожно перемешивать в течении 10 сек.
10. Инкубировать 20 минут при комнатной температуре.
11. Для остановки реакции внести в каждую лунку по 100 мкл стоп раствора, включая 2 лунки определения фона.
12. Осторожно перемешивать в течении 30 сек. **Важно, чтобы вестр синий цвет стал полностью желтым.**
13. С помощью считывателя для микротитровального планшета измерить оптическую плотность лунок при 450 нм в **течении 15 минут**.

ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ: Процедура промывки очень важна. Недостаточная промывка приведет к несоответствующему образованию цвета.

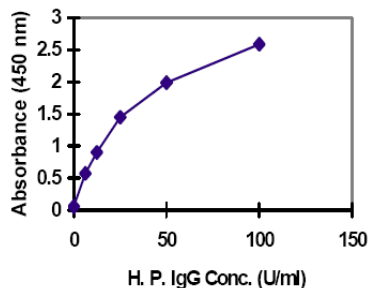
ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите среднее значение абсорбции для каждого набора референтных стандартов, контролей и образцов пациентов.
2. Создайте калибровочную кривую, составляя график средней абсорбции, полученной от каждого референтного стандарта против его концентрации в Е/мл на миллиметровой бумаге, со значениями абсорбции на вертикали или Y оси, и концентрациями на горизонтальной или X оси.
3. Использовать средние значения абсорбции для каждого образца, чтобы определить из калибровочной кривой соответствующую концентрацию *H. pylori* IgG в Е/мл.

ПРИМЕР КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ

Результаты типичного анализа стандарта, выполненного со считываниями оптической плотности при 450 нм, указаны на Y оси против концентрации *H. pylori* IgG на оси X. Эта калибровочная кривая используется только в целях иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных величин. Каждый пользователь должен получить свои собственные данные и калибровочную кривую.

<i>H. pylori</i> (Е/мл)	Абсорбция (450 нм)
0	0,059
6,25	0,573
12,5	0,901
25	1,450
50	1,988
100	2,591



(Пример калибровочной кривой).

ОЖИДАНИЯ ЗНАЧЕНИЯ

Уровень предела определения (cut-off) установлен в 20 Е/мл для образцов в норме. Значения ниже 20 Е/мл считаются в норме. Значения выше 20 Е/мл считаются положительными. Значения более 100 Е/мл должны заново анализироваться при большем разбавлении, например 1:802 (сначала 1:41, а затем 1:20). Результаты, полученные от этого 1:802 разбавления должны быть умножены на 20, чтобы отразить фактическую концентрацию *H. Pylori* IgG.

Сравнение данного набора и доступного в продаже набора ИФА отображено в следующей таблице:

		Референтный ИФА			
		N	E	P	Общее
ИФА	N	96 (D)	1	4 (B)	101
	E	2	2	1	5
	P	3 (C)	0	105 (A)	108
	Общее	101	3	110	214

Чувствительность = $A / (A+B) = 107/109 = 99\%$

Специфичность = $D / (C+D) = 96/99 = 97\%$

Точность = $(A+D) / (A+B+C+D) = 201 / 208 = 97\%$

Точность была оценена тестированием трех разных сывороток 20 репликантов в течении 4 дней. КВ в пределах и между анализами обобщены ниже:

	7,5 Е/мл	22 Е/мл	80 Е/мл
В пределах анализа	9,1%	8,5%	6,4%
Между анализами	10,5%	8,9%	7,5%

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Достоверные и воспроизводимые результаты будут получены, когда процедура анализа выполнена с полным пониманием инструкций и соблюдением хорошей лабораторной практики.
2. Процедура промывки крайне важна. Недостаточная промывка приведет к неполной точности и ошибочно повышенной абсорбции при считываниях.
3. В данном анализе не должны использоваться образцы с повышенной липемией, гемолизом или мутностью.

4. Результаты, полученные от использования этого набора должны использоваться только как дополнение к другим диагностическим процедурам и информации, располагаемой врачом.

Информация для заказа:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775-122
Тел/факс: (0342) 775-612
E-mail: info@diameb.com