



Набор ИФА для определения антител класса IgG к *Helicobacter pylori*

Кат. № : K5HPG
Количество тестов : 96
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 04-2008
Версия 11

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

ВВЕДЕНИЕ

Иммуно-ферментный анализ для количественного и/или качественного определения анти-геликобактер пилори IgG в человеческой сыворотке или плазме.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Ген кампилобактер подразумевает отрицательную бактерию Грема длиной 0,5-5 мкм и 0,2-0,5 мкм в диаметре. Набор *Helicobacter pylori* IgG предназначен для определения инфекции *H.pylori* пациентов при желудочно-кишечных симптомах.

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: инвазивной техникой, включая биопсию, после изучения культуры или гистологического изучения образцов биопсии или прямого определения активности уреазы; неинвазивной техникой, что включает тестирование мочи и серологические методы.

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

2. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор основывается на методе иммуноферментного анализа (ELISA), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. Во время первой инкубации анти- *H.pylori* IgG антитела, если не другие, связываются с *H.pylori*-антигеном, нанесенным на лунки. В промывочном цикле удаляется весь несвязанный материал. В последующей инкубации второе антитело (анти-человеческое IgG конъюгированное пероксидазой хрена) связывается в комплекс *H.pylori*-антиген-антитело. После дальнейшего этапа промывки бесцветный раствор хромогена в субстратном буфере (тетраметилбензидин, ТМВ) добавляется в лунки, где он путем реакции с ферментом пероксидазы превращается в вещество с характерным цветом. Образование цвет останавливается добавлением серной кислоты. Интенсивность цвета, измеряемая спектрофотометром при 450 и 405 нм, будет при этом прямо пропорциональна концентрации анти-*H.pylori* IgG антител в калибраторах и образцах.

3. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

- реагентов достаточно для 96 лунок
- хранить набор при 2-8°C
- срок годности каждого реагента указан на этикетке флакона
- после вскрытия, набор стабилен при 2-8°C в течение 2 месяцев.

3.1 СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ

- **Покрытый микропланшет:** 96 делимых лунок с привитым очищенным неактивным *H.pylori*. Хранить неиспользуемые

лунки при 2-8°C в соответствующей полиэтиленовой сумке, тщательно закрытым.

- **Калибраторы:** 4 флакона анти-*H.pylori* IgG в основе сыворотки в следующих концентрациях: 15, 30, 60 и 120 UR/мл. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готовы к использованию, красного цвета, кроме 15 UR/мл, синего цвета.
- **Ферментный конъюгат:** мышиноного моноклонального анти-*H.pylori* IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена, в основе сыворотки со стабилизаторами. Консервант: неомидин. Готов к использованию, розового цвета.

3.2 ОБЩИЕ РЕАГЕНТЫ для наборов следующих направлений: То.Р.С.Н.-S.T.D., детские, гастро-энтерологические и глютеносенные болезни

- **Промывочный раствор (концентрат):** 1 флакон (50 мл) PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (<0.05%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 дистиллированной водой. В случае нерастворенных кристаллов, заново восстановите раствор, оставив флакон на несколько минут при 37°C. Хранить в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Разбавитель образца (концентрированный):** 1 флакон (20 мл) основы сыворотки и стабилизаторов. Красного цвета. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Непосредственно перед использованием разбавить необходимое количество 1:20 с предварительно разбавленным промывочным раствором. Хранить в течении 30 дней при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль:** 1 флакон (2 мл) основы сыворотки с нереактивным анти-*H.pylori* IgG. Консервант: NaN₃ (<0.1%). Готов к использованию. Красного цвета. Отрицательная контрольная сыворотка должна использоваться как: 1) контроль в качественном анализе, и 2) точка калибратора при концентрации 0 UR/мл в количественном анализе.
- **Хромоген:** 2 флакона (15 мл) ТМВ с цитрат-фосфатным буфером, DMSO и H₂O₂. Готов к использованию.
- **Субстратный буфер:** 1 флакон (15 мл) цитрат-фосфатного буфера и H₂O₂. Жидкий.
- **Блокирующий реагент:** 1 флакон (14 мл) 1N H₂SO₄. Готов к использованию.
- **Самоклеющиеся пленки для планшета.**
- **Полиэтиленовый пакет.**

4. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1 Ручной анализ

- Регулируемые автоматические микропипетки со сменными насадками.
- Инкубатор, настроенный на 37+/-2 °C.
- Мерные колбы для разбавления образцов.
- Ручное или автоматическое оборудование для промывки лунок.
- Микропланшетный спектрофотометр с диапазоном 0-3,0 А, способный измерять абсорбцию при 450 и 405.
- Миллиметровая графическая бумага.
- Дистиллированная вода.

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

5. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

- Не смешивайте специфичные реагенты (см. 3.1) из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов (см. 3.2) из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуете:

- точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;

- периодам инкубации и температуре,

это может вызвать неправильные клинические результаты.

- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелюбимая промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая 37 +/-2°C может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.

Для того во избежание личного заражения и загрязнения среды, придерживайтесь следующих предостережений:

- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетуйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-НСV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

6. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Умеренно липемические или гемолизированные образцы могут повлиять на результаты. Образцы плазмы могут содержать волокнистые вещества, которые могут повлиять на анализ; перед анализом убедитесь, что образцы всегда идеально чистые. Храните образцы при 2-8°C в течении 1 недели. При более длительном хранении рекомендуется заморозить образцы до -20°C. Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

Перед использованием разбавьте образцы 1:300 разведенным разбавителем образца (см. РЕАГЕНТЫ). Пример: 10 мкл образца + 2990 мкл разбавителя образца.

7. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.

- переверачивая образец, смешайте его перед использованием.

1. Приготовьте лунки для бланка, контролей или калибраторов и образцов.
2. Распределите **100 мкл** контролей или калибраторов и разбавленных образцов в соответствующие лунки.
Примечание: контроли и калибраторы не должны разбавляться.
3. Внесите **100 мкл** разбавленного разбавителя образца в лунку бланка.
4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
5. Промойте лунки **3 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
6. Внесите **100 мкл** ферментного конъюгата во все лунки.
7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
8. Промойте лунки как описано в п 5.
9. Внесите **100 мкл** хромогена во все лунки.
10. Инкубируйте лунки в течении **10 минут при 37+/-2°C** или **15 минут** при комнатной температуре (18-25°C). Избегайте попадания прямого солнечного света.
11. Добавьте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
12. Считайте ОП желательно бихроматичным спектрофотометром при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (настроив аппарат на 0 с лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя.

8. СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 22 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ*

9.1 Качественный анализ

Должна приниматься во внимание ОП каждого отрицательного контроля и cut-off калибратора (пороговая величина 15 UR/мл). Присутствие или отсутствие анти-*H.pylori* IgG антител определяется сравнением абсорбции образца с абсорбцией cut-off контроля. Образцы с ОП ниже 15 UR/мл калибратора (cut-off калибратор) считаются неактивными к анти-*H.pylori* IgG антителам. Образцы с ОП выше чем в cut-off калибратора считаются реактивными к анти-*H.pylori* IgG антителам.

Образцы с значениями абсорбции в пределах +/-10% cut-off калибратора считаются сомнительными и должны быть подтверждены повторным анализом.

9.2 Количественный анализ

Отрицательный контроль берется за первую точку калибровочной кривой (значение 0 UR/мл), соответственно как часть кривой.

Нарисуйте калибровочную кривую на линейной графической бумаге, вывода концентрации калибратора (ось x) против абсорбций, полученных для каждого калибратора (ось y). Соответствующие концентрации анти-*H.pylori* IgG в UR/мл получают путем интерполяции абсорбции каждого образца на калибровочной кривой.

— Образцы с IgG показателями меньше 15 UR/мл считаются неактивными к анти-*H.pylori* IgG антителам.

— Образцы с IgG показателями больше 30 UR/мл считаются реактивными к анти-*H.pylori* IgG антителам.

— Образцы с IgG показателями между 15 UR/мл и 30 UR/мл считаются слабо реактивными.

* Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, спектрофотометрическое считывание проводится автоматически при 3 различных значениях длины волны: 450, 405 и 620 нм, тем самым расширяя диапазон кривой.

9.3 Пример вычисления

Последующие начения должны рассматриваться как пример и не должны использоваться как экспериментальные данные.

Описание	Абсорбция 450 нм	IgG анти- <i>H.pylori</i>
Калибратор 0 UR/мл	0,010	
Калибратор 15 UR/мл	0,600	
Калибратор 30 UR/мл	1,100	
Калибратор 60 UR/мл	1,750	
Калибратор 120 UR/мл	2,250	
Образец	1,830	70 UR/мл

Примечание: Отрицательный контроль = калибратор 0 UR/мл.
Путем интерполяции на калибровочной кривой образец демонстрирует для анти-Н.pylori IgG титр в 70 UR/мл.

9.4 Критерии достоверности

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что абсорбции контролей находятся в пределах следующих ожидаемых значений:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	< 0.100
ОП кал. 120 UR/мл / ОП кал. 15 UR/мл	> 2.3
ОП кал. 15 UR/мл / ОП кал. UR/мл	> 1.94

Если полученные значения не соответствуют ожидаемым, необходимо повторить анализ.

9.5 Интерпретация результатов

— Нереактивные образцы должны считаться отрицательными к к анти-Н.pylori IgG антителам.

— Реактивные и/или слабо реактивные образцы должны считаться положительными к анти-Н.pylori IgG антителам.

Соответствующие отклонения анализа крови одного и того же пациента могут быть только сравнены в одном и том же анализе. 60% варьирование абсорбции во втором образце может считаться важным указателем недавней или прогрессирующей инфекции. Высокие титры анти-Н.pylori IgG могут также указывать на недавнюю или прогрессирующую инфекцию. По сути, положительный результат может подтвердить диагноз гастрита или язвы двенадцатиперстной кишки, исходя из предварительный клинических показателей. К тому же, анализ IgG предоставляет быстрый и эффективный способ мониторинга лекарственной терапии. Уменьшение уровня IgG может случиться во время лечения, ведущего к уничтожению микроорганизмов.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность метода была оценена на соответствующей группе лиц без иммунитета к Н. pylori. Результат составил 96,2%.

10.2 Диагностическая чувствительность

Диагностическая чувствительность метода была оценена на соответствующей группе лиц, которые были инфицированы Н. pylori. Результат составил 95,8%.

10.3 Точность

Точность внутри и между анализами определена путем измерения КВ% (коэффициент вариации) 3 сывороток при разных концентрациях Н. pylori.

Повторяемость (внутри анализа)

Сыворотка	Средн. (UR/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	7.8	0.44	5.6	12
b	45.9	2.06	4.5	12
c	97.7	2.87	2.9	12

Воспроизводимость (между анализами)

Сыворотка	Средн. (UR/мл)	СО (%)	КВ (%)	К-во анализов
a	47,8	4,5	9,4	10
b	86,06	7,7	9,0	10
c	126,05	11,7	9,3	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Анализ предназначен только для обследования. Диагноз гастрита и извы желудка и двенадцатиперстной кишки должен быть подтвержден клинической оценкой и дальнейшей диагностикой. В случае болезни быстрое вмешательство значительно сократит риски.

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