

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgA К HELICOBACTER PYLORI

743-0201, H.Pylori IgA

Каталог. № : 743-0201

Методика от 08-2004

Количество : 96

Производитель: BCM Diagnostics
(Россия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор ELISA предназначен для качественного определения антител класса IgA к *Helicobacter pylori* в сыворотке крови человека. Набор предназначен только для диагностики *in vitro*.

КРАТКОЕ ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

В 1983 году Warren and Marshall (1) идентифицировали *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) как новый бактериальный грам-отрицательный патоген у пациентов, страдающих от гастритов. Это открытие привело к изучению связи между бактериальной инфекцией и хроническими заболеваниями желудка (2). Было доказано, что у пациентов с гастритами эрадикация бактерий приводит к выздоровлению (4).

Диагностические методы для выявления инфекции обычно включают в себя инвазивные (гастроскопия) методы для сбора образцов.

Однако, у инфицированных пациентов вырабатывается специфичный иммунный ответ. Следовательно, серологический тест представляет собой полезную альтернативу инвазивной биопсийной технике. Уровень IgG возрастает при инфицировании и остается постоянно высоким, пока инфекция не элиминируется. Следовательно, эффективность антимикробной терапии может быть отслежена по изменениям в уровнях специфичных IgG-антител. Определение уровня IgA-антител является комплементарным по отношению к IgG. Так как уровень IgA снижается быстрее, чем снижается уровень IgG у некоторых пациентов, проходящих лечение, определение этого параметра очень полезно при контроле за выздоровлением. По неизвестным причинам около 2% образцов сывороток положительны только в отношении IgA-антител (5, 6).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Настоящий набор для выявления IgA-антител к *Helicobacter pylori* основан на методе ELISA (5). Антиген связан с твердой фазой. Во время инкубации с разбавленной человеческой сывороткой специфические иммуноглобулины связываются с антигеном. После инкубации и промывки от несвязавшихся белков ячейки обрабатываются конъюгатом - моноклональными антителами против IgA-антител человека, мечеными пероксидазой. После второй инкубации и шага промывки ячейки инкубируются с субстратом. Развивающаяся синяя окраска пропорциональна концентрации специфических антител в образце сыворотки. После этого добавляется раствор серной кислоты - стоп-раствор, и степень ферментативного превращения субстрата определяется измерением поглощения с помощью микропланшетного спектрофотометра.

РЕАГЕНТЫ

- Настоящий набор содержит реагенты, достаточные для 96 определений.
- Все реагенты и образцы перед началом анализа должны быть выдержаны при комнатной температуре

А. Микропланшет Стрипы, покрытые антигенами:

один держатель стрипов, содержащий 12x8 (96) микроячеек, покрытых антигенами *Helicobacter pylori*. Открывайте упаковку на противоположном конце от напечатанного кода (P следует за номером лота), что поможет при необходимости идентификации. Достаньте из пакета держатель и стрипы, которые будут использованы, и поместите неиспользованные стрипы в полиэтиленовый пакет с осушителем, удалите воздух и закройте пакет.

В. Положительный контроль CONTROL+ (1x1,6 мл)

разведенная человеческая сыворотка с известной концентрацией IgA антител к *Helicobacter pylori* в 0.01 моль/л р-ре фосфатного буфера, содержащего 1% BSA и 0.09% азида натрия. Готов для использования.

Окраска раствора пропорциональна соответствующим титрам антител.

С. Контроль CUT OFF (1x2,0 мл)

разведенная человеческая сыворотка с известной концентрацией IgA антител к *Helicobacter pylori* в 0.01 моль/л р-ре фосфатного буфера, содержащего 1% BSA и 0.09% азида натрия. Готов для использования.

Окраска раствора пропорциональна соответствующим титрам антител.

Д. Конъюгат моноклональных антител CONJUGATE (1x16мл)

моноклональные анти-человеческие IgA-антитела, меченые пероксидазой в фосфатном буфере, содержит фенол 0,05% и Bronidox 0.02%. Готов для использования.

Е. IgA отрицательный контроль CONTROL- (PF93910) (1x1,6 мл)

человеческая сыворотка в 0.01 моль/л р-ре фосфатного буфера, содержащего 1% BSA и 0.09% азида натрия. Готов для использования.

Г. Концентрат промывочного буфера 10 x WASH BUFFER (PF93603) (1x100мл)

фосфатный буфер, сконцентрированный в 10 раз; содержит 0,5% Brij. Должен быть разбавлен в 10 раз дистиллированной или деионизированной водой перед использованием. При наличии кристаллов, их следует растворить нагреванием при 37°C перед тем как разводить концентрат.

Н. Концентрат Разбавителя образцов 50X IgA DILUENT (1x4,5 мл) (PF93703)

используется для разведения образцов.

Белковый раствор с моноклональными анти-человеческими IgG-антителами, содержит фенол 0.05% Bronidox 0.02%.

Приготовление: для того, чтобы получить готовый к использованию разбавителя образцов разбавьте требуемый объем концентрата 1:50 в промывочном буфере.

И. Раствор субстрата ТМБ (12 мл) SUBSTRATE (PF93619)

содержит тетраметилбензидин 0,26 мг/мл и перекись водорода 0,01%, стабилизированные в цитратном буфере 0,05 моль/л (рН 3.8). Готов для использования.

Ж. Стоп-раствор (1x16 мл) STOP SOLUTION (PF93602)

содержит раствор 0.3 моль/л H₂SO₄. Готов для использования.

АДГЕЗИВНЫЕ ПЛЕНКИ (2)

ПОЛИЭТИЛЕНОВЫЙ ПАКЕТ (1)

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Инкубатор на 37°C.
- Микропланшетный ридер, способный проводить измерения при 450 нм или при 450/620 нм, с линейностью ОП до 2,000 (по крайней мере).
- Автоматический микропланшетный вошер (предпочтительно) способный подавать объемы в интервале 225-375 мкл.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Стандартная лабораторная стеклянная посуда: цилиндры, пробирки и т.п.
- Микропипетки на 10, 100 и 1000 мкл.
- Одноразовые перчатки.
- Таймер.
- Раствор гипохлорита натрия (5%).
- Контейнеры для потенциально инфекционно опасных материалов.
- Фильтровальная бумага.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты должны храниться при 2-8°C.

Срок годности каждого компонента набора указан на этикетке коробки.

Реагенты имеют ограниченный срок стабильности после вскрытия и/или приготовления

РЕАГЕНТ	УСЛОВИЯ
Микропланшет	6 недель при 2-8°C в полиэтиленовом пакете
Контроли	6 недель при 2-8°C
Конъюгат	6 недель при 2-8°C
Субстрат	До истечения срока годности при 2-8 °C; 1 неделю

	при 15-30°C; хранить в темноте
IgA Разбавитель образцов	Готовый к использованию, 2 недели при 2-8°C;
Промывочный буфер	2 недели при 2-8°C; 5 дней при 15-30°C
Стоп-раствор	До истечения срока годности при 2-8°C

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Набор предназначен только для диагностики *in vitro*. ХРАНИТЬ ПРИ 2-8 °С.

Предупреждение:

Этот набор содержит реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазмы. Использованные сыворотка или плазма тестировались методом, утвержденным FDA, и найдено, что они не содержат антител к ВИЧ-1/2, HCV и HBsAg. Тем не менее, так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия ВИЧ, HCV, вируса гепатита В или каких-либо других инфекционных агентов, то с данными реагентами надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

Техника безопасности:

- Не пипетируйте ртом. Используйте одноразовые перчатки и защиту для глаз при манипуляциях с образцами и проведении анализа. Тщательно мойте руки после окончания работы.
- Следующие реагенты содержат небольшие концентрации вредных или едких веществ:
 - промывочный буфер содержит детергент
 - конъюгат содержит фенол
 - субстрат является кислотой
 - контроли содержат 0,9% азида атрия, который может вступать в реакцию со свинцом и медью, содержащихся в элементах водопроводной системы, образуя взрывоопасные азиды металлов; смывайте реагенты большим количеством воды.
 Если какой-либо из реагентов попал на Вашу кожу или в глаза, промойте область поражения большим количеством воды.
- Не одноразовые аксессуары после использования необходимо стерилизовать. Предпочтительный метод – автоклавирование в течение 1 часа при 121°C. Одноразовые – должны быть автоклавированы или сожжены.
- Серная кислота, используемая в качестве стоп-раствора, и соляная кислота, используемая для мытья стеклянной посуды, является едкими веществами, и требуют осторожного обращения. Если кислота попала на Вашу кожу или в глаза, промойте область поражения большим количеством воды.
- Нейтрализованные кислоты и другие жидкие отходы должны быть деконтаминированы с помощью добавления достаточного объема гипохлорита натрия до достижения конечной концентрации, по крайней мере, 1%. Для эффективной деконтаминации необходима 30 минутная экспозиция в 1% гипохлорите натрия.
- Разбрызганный потенциально инфекционный материал необходимо немедленно удалить с помощью адсорбирующей бумаги, а контаминированную область протереть, например 1% раствора гипохлорита натрия, перед тем как продолжить работу. Не используйте гипохлорит натрия до тех пор пока капли, содержащие кислоту, не будут полностью удалены и область поражения не высохнет. Материалы, используемые для удаления брызг, включая перчатки, должны утилизироваться как потенциально биологически опасные отходы. Не автоклавируйте материалы, содержащие гипохлорит натрия.

Аналитические предосторожности:

- Перед использованием позвольте всем реагентам и образцам нагреться до комнатной температуры (18-30°C). Немедленно после использования поместите реагенты в условия с рекомендованной температурой хранения. **Очень важно работать при корректной температуре. Убедитесь в том, что Ваш термостат поддерживает температуру не ниже 35°C и не выше 39°C.** Открывайте пакет со стрипами не ранее, чем через 30 минут после выдерживания при комнатной температуре.
- Не используйте реагенты после истечения срока годности. Необходимо предотвращать микробную контаминацию реагентов, так как в противном случае снижается срок годности, и могут быть получены ошибочные результаты.
- Не изменяйте процедуру анализа и не заменяйте реагенты набора реагентами других производителей или из других лотов (если взаимозаменяемость реагентов не оговорена в инструкции отдельно). Не сокращайте рекомендованное время инкубации.
- Любую стеклянную посуду, используемую с реагентами, необходимо тщательно вымыть 2М соляной кислотой, а затем

прополоскать дистиллированной водой или деионизированной водой высокого качества.

- Не оставляйте реагенты на ярком свете или в парах гипохлорита во время хранения или на этапе инкубации.
- Не позволяйте ячейкам пересыхать во время проведения анализа.
- Не допускайте кросс-контаминации реагентов.
- Не дотрагивайтесь до ободков ячеек и не разбрызгивайте на них конъюгат. Не допускайте смешивания содержимого разных ячеек микропланшета.
- Иногда при иммуноферментном анализе может возникать краевой эффект, который можно минимизировать путем увеличения влажности во время инкубации. Микропланшет должен быть накрыт специальной пленкой, и инкубироваться при 37°C в водяной бане в специальном держателе для микропланшетов или в инкубаторе. Альтернативно микропланшет можно инкубировать в предназначенном для этого анализаторе. Для детального объяснения обратитесь к соответствующим инструкциям. Нельзя использовать CO₂ инкубаторы.
- Перед считыванием оптической плотности убедитесь в том, что дно микропланшета чистое и сухое, а на поверхности жидкости нет пузырьков.
- Использование сильно гемолизованных образцов, не полностью свернувшейся сыворотки или образцов с микробной контаминацией может привести к получению неправильных результатов.
- Использование набора с автоматическими системами должно быть обосновано пользователем.
- Необходимо внимательно изучить инструкции для каждого используемого прибора:
 - Инсталляция и все необходимое для нее
 - Принципы работы, инструкции и риски
 - Спецификация производителя и производительность оборудования
 - Сервис и обслуживание.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ХРАНЕНИЕ

Образцы сыворотки крови, отобранной из вены обычным образом с соблюдением необходимых предосторожностей. Свежая сыворотка может храниться до 4 дней при 2-8°C, или в течение более продолжительного времени при -20°C; образцы могут подвергаться оттаиванию не более 3 раз. Размороженные образцы необходимо осторожно перемешать перед проведением анализа. Тепловая инактивация может привести к получению ошибочных результатов. На качество образца серьезно влияет микробная контаминация, которая может привести к получению неправильного результата. Сильно липемические, иктеричные или контаминированные образцы нельзя использовать. Если невозможно получить новый образец, то подобные пробы необходимо очистить фильтрацией (0,45 мкм) или центрифугированием (3000об/мин x 10 минут).

Набор нельзя использовать для работы с плазмой.

ПРОЦЕДУРА

- Приготовьте необходимое количество стрипов.
- Приготовьте Промывочный буфер (разведите необходимое количество концентрата 10x) (100мл + 900 мл H₂O).
- Приготовьте необходимое количество разбавителя образцов путем разведения 1 части Концентрата IgA разбавителя образцов (50x) в 49 частях разведенного (готового к употреблению) промывочного буфера (пример: 2 мл + 98 мл готового к употреблению промывочного буфера).

Оставьте одну ячейку для бланка (на соответствующем этапе в эту ячейку вносят 100 мкл субстратной смеси). Разведите образцы 1:101, для этого смешайте 10 мкл сыворотки и 1 мл Разбавителя.

Внесите по 100 мкл каждого разведенного образца в соответствующие ячейки (рекомендуется анализ в дублях). Внесите НЕРАЗВЕДЕННЫЕ калибраторы в соответствующие лунки (по 100 мкл в ячейку) – необходимый минимум 1 отрицательный контроль, 2 контроля Cut off и 1 положительный контроль. Накройте ячейки защитной пленкой и инкубируйте 45 минут при 37°C. Затем промойте Промывочным буфером четыре раза с замачиванием по 30 секунд (300 мкл), после этого внесите по 100 мкл конъюгата в каждую ячейку и инкубируйте 45 минут при 37°C, накрыв ячейки защитной пленкой. Промойте снова четыре раза, как описано выше. Затем внесите по 100 мкл субстрата в каждую ячейку.

Через 15 минут инкубации при комнатной температуре иммуноферментную реакцию останавливают, добавляя по 100 мкл Стоп раствора.

В течение 30 минут считать абсорбцию (ОП) при 450 нм или 450/620 нм. Если полученные значения ОП превышают 2,000, то проведите измерение при 405 нм.

ПРОТОКОЛ ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgA к *Helicobacter pylori*.

ШАГ 1	Внесите по 100 мкл разбавленных образцов/неразбавленных калибраторов в соответствующие ячейки --- Инкубируйте 45 минут при 37°C --- Промойте 4 раза (по 300мкл) ---
ШАГ 2	Внесите по 100 мкл конъюгата в каждую ячейку --- Инкубируйте 45 минут при 37°C --- Промойте 4 раза (по 300мкл) ---
ШАГ 3	Внесите по 100 мкл субстрата в каждую ячейку --- Инкубируйте 15 минут при комнатной температуре ---
ШАГ 4	Внесите по 100 мкл Стоп раствора в каждую ячейку --- Считайте абсорбцию при 450 нм в течение 30 минут

ДОСТОВЕРНОСТЬ ТЕСТА

Вычитайте значение бланка ($\leq 0,15$) из всех остальных считываний. Оптическая плотность сыворотки Cut-Off должна быть в пределах 25% отклонения от среднего значения оптической плотности при анализе в триплете. Отбросьте любое патологическое значение, и повторно вычислите среднее. Положительный контроль должен быть, по крайней мере, в 1,5 раза выше Cut-off контроля. Отношение между Негативным Контролем и Cut-off контролем должно быть менее, чем 0,6.

О.П. Cut-off должна быть $\geq 0,2$ при 450 нм и $\geq 0,16$ при 450/620 нм.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитайте отношение между средней оптической плотностью образца и оптической плотностью Cut-Off (индекс). Образцы рассматриваются как:

Положительный: если отношение $> 1,2$

Сомнительный: $\pm 20\%$

Отрицательный: если отношение $< 0,8$

Если результат сомнителен, повторите тест. Если новый результат также сомнителен, заберите и проанализируйте новый серологический образец.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Использование липемичных, иктеричных, гемолизированных образцов, или инaktivированной тепловой обработкой сыворотки может привести к получению неправильных результатов. Результаты теста должны использоваться в совокупности с информацией, полученной в других диагностических процедурах.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Аналитическая специфичность этого набора оценивалась в тесте ингибирования. *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* и *E. coli* были внесены в образцы сывороток пациентов. Не было выявлено различий между референсными образцами и образцами, в которые были добавлены перечисленные антигены. Следовательно, тест специфичен в отношении специфических анти- *Helicobacter pylori* IgA.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ

В ходе клинического исследования, проведенного в госпитальной лаборатории, был проанализирован 171 образец сыворотки, после эндоскопической оценки пациентов: 110 из этих образцов были признаны положительными на присутствие *Helicobacter pylori* по результатам биопсии желудка.

		Референсный метод	
		+	-
Набор ВСМ	+	95	2
	-	15	59

Чувствительность и специфичность составили соответственно 88% и 96,8%.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Внутри серии (три разных лота).

Cut Off n=16	Лот N. 31	Лот N. 32	Лот N. 33
ОП	0.267	0.472	0.494
CV%	10	14	12

Между сериями

Образец	AU/ml				CV%
	I	II	III	Среднее	
РУА1	0.2	0.3	0.3	0.3	17
РУА2	1.2	1.0	1.4	1.2	18
РУА3	2.5	2.0	2.8	2.4	18

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗМОЖНЫХ ПРОБЛЕМ

ПРОБЛЕМА	ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЕЙСТВИЯ
Результаты недействительны (все отрицат.)	Один или более реагентов не добавлен, либо добавлен(ы) в неправильной последовательности	Перепроверьте процедуру. Проверьте на предмет неиспользованных растворов. Повторите тест.
	Инертный микропланшет	Проверьте код на упаковке микропланшета (правильный код см. пункт IV)
		Проверьте на влажность неиспользованный микропланшет (осушитель силикагель должен быть бледно желтого цвета). Повторите тест.
Результаты недействительны (все положит.)	Контаминация субстрата	Возьмите новую аликвоту субстрата
	Некачественная промывка	Убедитесь в том, что оборудование для промывки работает хорошо
	Неполная промывка ячеек	Убедитесь в том, что оборудование для промывки работает хорошо
	Некачественная аспирация содержимого ячеек	Убедитесь в том, что оборудование для промывки работает хорошо
	Ошибки пипетирования	Проверьте работу пипеток
	Реагенты вносятся слишком медленно	Не допускайте высыхания планшета после промывки. Вносите реагенты немедленно.
	Наличие пузырьков	Не допускайте появления пузырьков воздуха при пипетировании.
	Помехи в оптической системе	Проверьте на загрязнение источник света и детектор прибора. Протрите дно микропланшета мягкой тканью.
Неадекватная окраска	Некорректное время инкубации или температура	Проконтролируйте температуру и время
		Обратитесь к рекомендациям инструкции.
	Неправильный объем внесенного субстрата	Проверьте работу пипеток



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com