

НАБОР ИФА
ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И
КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К
HELICOBACTER PYLORI В СЫВОРОТКЕ И
ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

EIA-3484, Helicobacter pylori IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3484
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2013
Версия 15.0



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

1 ВВЕДЕНИЕ

1.1 назначение использования

Набор DRG Helicobacter pylori IgG (Recombinant) ELISA предоставляет материалы для количественного и качественного определения антител класса IgG к Helicobacter pylori в сыворотке и плазме человека.

Данный анализ предназначен только для диагностики in-Vitro.

2 ПРИНЦИП РАБОТЫ ТЕСТА

Набор DRG Helicobacter pylori IgG (Recombinant) ELISA является твердофазным иммуноанализом. Микротитровальные лунки в качестве твердой фазы покрыты рекомбинантными антигенами Helicobacter pylori. Разведенные образцы пациента и готовые к использованию контроли пипетируются в лунки. Во время инкубации специфичные к Helicobacter pylori антитела положительных образцов и контролей связываются с иммобилизованными антигенами.

После промывки (для удаления несвязанных образцов и контролей) в лунки добавляется конъюгат антител IgG человека с меткой пероксидазы хрена. Во время второй инкубации этот конъюгат связывается специфически с антителами IgG, в результате чего формируются иммунные комплексы с ферментативными связями. После второй промывки (для удаления несвязанного конъюгата) сформированные иммунные комплексы (в случае положительного результата) определяются в ходе инкубации с субстратом ТМБ, в результате чего появляется синее окрашивание. Синее окрашивание меняется на желтое при добавлении серной кислоты для остановки индикаторной реакции.

Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству в образце антител, специфичных к Helicobacter pylori. Абсорбция считывается при 450 нм на микропланшетном ELISA-ридере.

ПРИМЕЧАНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Данный набор предназначен только для in-Vitro диагностики.
- Относительно информации по безопасности, которые включены в набор, следуйте листу данных по безопасности.
- Этот набор может содержать реагенты, приготовленные из человеческой сыворотки или плазма. Используемые 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.
- Избегайте контактов с кислотой стоп раствора. Это может привести к раздражению кожи и ожогам.
- Не пипетируйте ртом и избегайте контакта кожи и слизистых с реагентами.
- Не курите, не пейте, не ешьте и не применяйте косметику в местах работы с реагентами.
- Используйте одноразовые перчатки при обращении с образцами и реагентами. Микробиологическое загрязнение реагентов или образцов может влиять на результаты.
- Обращайтесь с реагентами согласно правилам безопасности.
- Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- Необходимо придерживаться всех объемов, описанных в инструкции. Оптимальные тестовые результаты получают при использовании калиброванных пипеток.

- Не смешивайте компоненты разных наборов. Не рекомендуется менять местами лунки разных планшеток даже от одного набора. Наборы могут транспортироваться разными способами, поэтому допускается незначительное различие.
- Химикалии и приготовленные или использованные реагенты необходимо обрабатывать согласно требованиям безопасности.
- Лист данных безопасности доступен по требованию.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Содержимое набора

1. **Микротитровальные лунки**, 12 x 8 (делимых) стрипов, 96 лунок; лунки покрыты рекомбинантным антигеном Helicobacter pylori (Cag A). (Включая 1 держатель для стрипов и 1 пленку для накрывания)
2. **Разбавитель образцов***, 1 фл., 100 мл, готов к использованию, желтого цвета; pH 7.2 ± 0.2.
3. **Стандарты (1 - 3)***, 3 фл., S1-S3 2.0 мл, готовы к использованию; Концентрации: 15, 75, 150 Ед/мл (Ед/мл = Единицы DRG /мл), желтого цвета, белые крышки.
4. **Положительный контроль***, 1 фл., 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, красная крышка.
5. **Отрицательный контроль (Стандарт 0)***, 1 фл., 2.0 мл, готов к использованию, желтого цвета, желтый колпачок.
6. **Ферментный конъюгат***, 1 фл., 20 мл, готов к использованию, красного цвета, Антитело к IgA человека, конъюгированное с пероксидазой.
7. **Раствор субстрата**, 1 фл., 14 мл, готов к использованию, ТМБ.
8. **Стоп раствор**, 1 фл., 14 мл, готов к использованию, сод. H₂SO₄ 0.2 Моль/л. Избегать контакта со стоп-раствором. Может вызвать ожоги и раздражение кожи.
9. **Промывочный раствор***, 1 фл., 30 мл, (20x концентрированный для 600 мл), pH 6.5 ± 0.1. См. п. «Приготовление реагентов».

* содержит безртутный консервант.

4.1.1 Оборудование и материалы не входящие в состав набора:

- Калиброванный спектрофотометр для микропланшетов (450/620нм ±10 нм)
- Калиброванные прецизионные микропипетки переменного объема
- инкубатор, 37 °C
- Ручной или автоматический промыватель лунок
- Миксер для пробирок
- Деионизированная или (свежая) дистиллированная вода
- Таймер
- Впитывающая бумага

4.2 Стабильность и хранение

Реагенты стабильны до даты срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2±8 °C. Не использовать реагенты после окончания срока годности.

Вскрытые реагенты хранить при температуре 2-8 °C
Микротитровальные лунки хранить при 2-8 °C в плотно закрытом пластиковом пакете.

Вскрытый набор стабилен до 2 месяцев при надлежащем хранении.

4.3 Подготовка реагентов

Привести все реагенты и используемые полоски к комнатной температуре перед использованием.

Рабочий промывочный раствор

Развести промывочный раствор **1+19** (напр. 10 мл + 190 мл) свежей, очищенной от бактерий редистиллированной водой. Этот раствор имеет значение pH 7.2 ± 0.2.

Потребление: ~5 мл на определение.

Кристаллы в растворе исчезают при нагревании до 37 °C на водяной бане. Убедиться, что кристаллы полностью растворились перед использованием.

Стабильность после разведения: 4 недели при 2 - 8 °C.

4.4 Утилизация набора

Утилизация набора должна производиться в соответствии с национальными правилами. Особая информация по данному продукту указана в Паспорте данных безопасности (см. главу 13 Паспорта).

4.5 Поврежденные наборы

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, следует немедленно уведомить поставщика в письменной форме, не позднее чем через неделю после получения набора. Поврежденные компоненты набора не следует использовать для анализа. Поврежденные компоненты необходимо сохранить до принятия

окончательного решения. После этого поврежденные компоненты следует уничтожить в соответствии с официально установленными правилами.

5 ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма (ЭДТК-, гепариновая- или цитратная плазма) могут использоваться для данного теста. Не использовать гемолизованную, желтушную, липемическую сыворотку.

Примечание: Образцы, содержащие азид натрия, не должны использоваться для анализа.

5.1 Взятие образцов

Сыворотка:

Собрать кровь венопункцией, дать свернуться, отделить сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугировать до полного свертывания. Образцы пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, могут потребовать более долгого времени свертывания.

Плазма:

Собрать цельную кровь в пробирки, содержащие антикоагулянт, и центрифугировать немедленно после забора.

5.2 Хранение образцов

До анализа образцы следует хранить закрытыми до 24 часов при 2 - 8 °С. Для более долгого хранения заморозить только один раз до - 20 °С или ниже. Оттаявшие образцы перед постановкой инвертировать несколько раз.

5.3 Разведение образцов

Развести каждый образец пациента **1+100** раствором для разведения образцов, напр., 10 мкл образца + 1 мл *разбавителя*, хорошо смешать, дать постоять **15 минут**, хорошо смешать.

Примечание: Положительный и отрицательный контроли готовы к использованию и их не надо разводить!

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- **Очень важно довести все компоненты до комнатной температуры перед началом анализа!**
- После начала процедуры все этапы должны проводиться непрерывно.
- Во избежание перекрестного загрязнения реагентов использовать новые одноразовые наконечники для каждого реагента и образца.
- Абсорбция является функцией времени инкубации и температуры. Перед анализом рекомендуется приготовить все реагенты, удалив с них крышки, требуемое число лунок установить в держатель. Это обеспечит одинаковые промежутки между этапами пипетирования без перерывов.
- Как правило, ферментативная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.
- Плотно закрывать крышки флаконов с реагентами сразу после использования во избежание испарения и микробного загрязнения.
- После хранения ранее вскрытых реагентов проверить конъюгат и контроли на микробное загрязнение перед дальнейшим использованием.
- Во избежание перекрестного загрязнения и завышенных результатов необходимо аккуратно пипетировать образцы пациентов и вносить конъюгат без распыливания, на дно лунок.
- Во время инкубации накрывать микротитровальные лунки пленкой, чтобы не допустить испарения.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Перед проведением анализа развести *Промывочный раствор*, **подготовить образцы пациентов как описано в п.5.3**, тщательно перемешать перед пипетированием и составить **схему распределения и идентификации** образцов, стандартов и контролей.

1. Отобрать требуемое количество микротитровальных стрипов или лунок и поместить их в держатель.
Разместите по меньшей мере:
1 лунка (напр., А1) для бланка субстрата,
1 лунка (напр., В1) для Отрицательного контроля,
3 лунки (напр., от С1 и для стандартов 1-3, дальше)
1 лунка (напр., F1) для положительного контроля.
На усмотрение пользователя контроли и образцы пациентов можно исследовать в дублях.

2. Внести
100 мкл Отрицат. Контроля в лунку В1
100 мкл Стандарта 1 в лунку С1
100 мкл Стандарта 2 в лунку D1
100 мкл Стандарта 3 в лунку E1
100 мкл Положит. Контроля в лунку F1 и
100 мкл каждого разбавленного образца с новыми одноразовыми наконечниками в соответствующие лунки.
Оставить лунку **A1** для бланка субстрата!
3. Накрывать лунки пленкой, поставляемой в наборе. Инкубировать **1 час при 37°С**.
4. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз** с 300 мкл рабочего промывочного раствора.
Примечание: Промывка очень важна! Плохая промывка может привести к низкой точности и завышенным значениям абсорбции. В конце осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!
5. Поместить **100 мкл** Ферментного конъюгата в каждую лунку, **кроме А1**.
6. Инкубировать **30 минут при комнатной температуре (20 - 25 °С)**. *Не подвергать воздействию прямого солнечного света!*
7. Удалить содержимое лунок и промыть их **5 раз** с 300 мкл рабочего промывочного раствора. В конце осторожно удалить остатки жидкости, выстучав стрипы на салфетку перед следующим этапом!
8. Поместить **100 мкл** раствора ТМБ во все лунки.
9. Инкубировать **ровно 15 минут при комнатной температуре (20 ÷ 25 °С) в темноте**.
10. Остановить реакцию добавлением **100 мкл Стоп раствора** в каждую лунку. Любое синее окрашивание, проявившееся во время инкубации, переходит в желтое.
Примечание: высоко-положительные образцы пациентов могут иметь темный осадок хромогена!
11. Считать оптическую плотность при **450/620 нм** при помощи микропланшетного ридера **в течение 30 минут** после добавления *Стоп раствора*.

6.3 Измерение

Настроить микропланшетный ридер для ELISA на **ноль**, используя **бланк субстрата в лунке А1**.

Если по техническим причинам ELISA ридер не может быть настроен на ноль используя бланк субстрат в лунке А1, вычитайте значение абсорбции лунки А1 из всех остальных значений абсорбции.

Измерить абсорбцию во всех лунках при 450 нм и записать значения абсорбции для каждого контроля и образца пациента в схему.

Двойная длина волны – рекомендуется считать на 620 нм как референтной длине волны.

Где возможно, **рассчитайте среднее значение абсорбции** всех дублей.

7 РЕЗУЛЬТАТЫ

7.1 Оценка результатов

Анализ считается действительным при соблюдении следующих условий:

Бланк субстрата в А1: абсорбция ниже **0.10**

Отр. Контроль (Ст. 0) в В1: абсорбция ниже **0.20**

Стандарт 1 в С1: абсорбция между **0.35 – 0.85**

Стандарт 2 в D1: абсорбция между **0.90 – 2.10**

Стандарт 3 в E1: абсорбция между **1.80 – 3.00**

Пол. Контроль в F1: абсорбция между **0.65-3.00**

7.2 Расчет количественного результата

Для получения **количественного результата в Ед/мл** отложить значения абсорбции отрицательного контроля (Стандарт 0), стандартов 1, 2 и 3 на миллиметровой бумаге в системе координат напротив соответствующих им концентраций (0, 15, 75, 150 Ед/мл) и начертить стандартную калибровочную кривую. (значения абсорбции на оси Y, концентрации на оси X).

Считать результат по этой стандартной кривой, используя (средние) значения абсорбции образцов и контроля. Можно использовать доступное ПО для автоматического прочтения результатов и расчета концентраций. Можно использовать следующие математические функции: линейная регрессия, или поточечная аппроксимация стандартной кривой.

ПРИМЕЧАНИЕ: Значения дополнительно (1:10) разбавленных результатов должны быть умножены на соответствующий коэффициент разведения. (Разведение 1:10 = Коэффициент разведения: 10)

7.3 Интерпретация количественного результата

Нормальные значения для данного анализа каждая лаборатория должна устанавливать самостоятельно.

Следующие значения приводятся в качестве примера:

Пограничное значение: 15 Ед/мл

Положительный результат: > 18 Ед/мл
Сомнительный результат: 15 - 18 DU/мл
Отрицательный результат: < 15 DU/мл

7.4 Расчет **качественного** результата

Значение абсорбции **Стандарта 1** (пограничного) = CO
 Пример: 0.56 = CO

7.5 Интерпретация **качественного** результата

ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ: (средние) значения абсорбции образцов пациентов более чем на 20% превышают CO (Средняя ОП пациента > 1.2 x CO)

СОМНИТЕЛЬНЫЙ: (средние) значения абсорбции образцов пациентов от CO до 20 % выше CO => повторить анализ через 2 - 4 недели – на **новых** образцах (CO ≤ Средняя ОП пациента ≤ 1.2 x CO)
 Результат второго теста опять сомнительный => итоговый результат **ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ**

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ (средние) значения абсорбции образцов пациентов ниже CO (Средняя ОП пациента < CO)

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с региональными и государственными нормами. Использование контрольных образцов необходимо для подтверждения достоверности рутинных тестов. Использовать контроли при нормальных и патологических уровнях.

Так же рекомендуется использовать отечественные и международные программы оценки качества, для того чтобы обеспечить точность результатов.

Если результат анализа не соответствует установленным допустимым диапазонам контрольных материалов, результат пациента считается недействительным.

В этом случае необходимо проверить следующие технические моменты: дозирующие устройства, таймеры, даты срока годности реагентов, условия инкубации и хранения, методы аспирации и промывки.

После проверки вышеуказанных пунктов и не обнаружении ошибок в процедуре необходимо связаться с вашим поставщиком продукции DRG.

9 РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

9.1 Динамический диапазон анализа

Составляет 0.014-150 ДЕд/мл.

9.2 Специфичность антигена (Перекрестная реактивность)

Антиген, используемый для данного анализа, перекрестно не реагирует с *Brucella abortus*, *Candida albicans*, *Chlamidia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma pneumonia*, *Echinococcus*, *Fasciola* и *Toxoplasma gondii*.

9.3 Аналитическая Чувствительность

Составляет 0.014 ДЕд/мл.

9.4 Диагностическая специфичность (100 %)

Определяется как способность тест-системы показать отрицательный результат при отсутствии специфичных анализатов. Для оценки использовались 79 донорских сывороток (Германия), отобранные по случайному принципу. Эти сыворотки исследовались с помощью набора DRG Helicobacter IgG ELISA параллельно с другим коммерчески доступным набором для IgG ELISA.

9.5 Диагностическая чувствительность (100%)

Определяется как способность тест-системы показать положительный результат в присутствии специфичного анализата. Для оценки использовались 69 донорских сывороток (Германия), отобранные по произвольному принципу.

9.6 Сравнение методов

Данный набор сравнивался с Mikrogen H.pylori IgG ELISA. Анализировались 79 образцов.

n=79		Mikrogen ELISA	
		Положит.	Отрицат.
DRG ELISA Партия 1	Положит.	69	0
	Отрицат.	0	10

9.7 Воспроизводимость

9.7.1 Воспроизводимость в постановке определялась измерениями 12 контрольных образцов 20 раз.

Образец	Средняя конц. (ДЕд/мл)	CV, %	n
1	2.51	9.42	20
2	2.40	9.70	20
3	10.75	6.95	20
4	20.43	5.94	20
5	23.36	7.09	20
6	26.67	6.80	20
7	39.00	2.91	20
8	23.36	7.09	20
9	45.61	6.63	20
10	127.32	2.81	20
11	128.74	2.53	20
12	148.76	2.52	20

9.7.2 Воспроизводимость между постановками определялась повторными измерениями трех контрольных образцов.

Образец	Средняя конц. (ДЕд/мл)	CV, %	n
1	74.63	8.18	40
2	57.52	4.67	40
3	143.21	4.95	40

9.8 Восстановление (См. таблицу в оригинале инструкции).

9.9 Линейность (См. таблицу в оригинале инструкции).

10 ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Бактериальное загрязнение или многократное замораживание/оттаивание образцов могут повлиять на значения абсорбции. Результаты пациентов с ослабленным иммунитетом, а так же новорожденных имеют ограниченное диагностическое значение.

10.1 Интерферирующие субстанции

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0.5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты.

11 ЮРИДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

11.1 Достоверность результатов

Анализ должен выполняться в строгом соответствии с вложенной в набор инструкцией. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правил Надлежащей лабораторной практики или прочих национальных стандартов и/или законов. Это особенно важно для использования контрольных реагентов. Наряду с образцами пациента важно включать в каждую постановку достаточное количество образцов для подтверждения диагностической достоверности и сходимости анализа.

Результаты анализа действительны только в том случае, когда все контроли находятся в пределах указанных допустимых диапазонов, и все другие параметры анализа также соответствуют указанным спецификациям тест-системы.

11.2 Терапевтические последствия

Терапевтические последствия не должны основываться только на результатах лабораторных тестов. Любой результат лабораторного анализа является только частью клинической картины пациента. Диагностика инфекции не должна основываться на результате одного теста. Точный диагноз должен учитывать историю болезни, симптоматику и серологические данные.

Выводы о лечении могут приниматься только в случае соответствия результатов лабораторного анализа клинической картине пациента.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора или замена/одновременное использование компонентов разных лотов одного наименования может привести к ошибочному результату. Такое изменение / замена делают претензию недействительной.

Рекламации, связанные с неправильной интерпретацией пользователем результатов анализа так же недействительны. Вне зависимости от причины рекламации, ответственность производителя не превышает стоимость набора. Производитель не несет ответственность за любые повреждения, возникшие при транспортировке набора.



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