

## НАБІР ІФА

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИ-Н.PYLORI АНТИТІЛ ТИПУ IgG, IgA АБО IgM

**1425-300, 1525-300, 1625-300, Anti-H.Pylori IgG, IgM & IgA**  
**Test Systems**

Каталог. №: **1525-300**

Методика від **06-07-2012**

Кількість : **96**

Версія **4**

Виробник : **Monobind Inc., (США)**



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

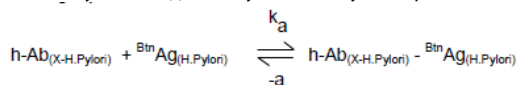
Кількісне визначення специфічних анти-Н.pylori антитіл типу IgG, IgA або IgM в сироватці або плазмі людини за допомогою мікропланшетного імуноферментного аналізу.

**2. ВСТУП** (Див. оригінал інструкції).

### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

#### Метод послідовного ІФА типу "Сендвіч" (ТИП 1)

Реагенти, необхідні для послідовного аналізу ІФА, включають іммобілізований антиген, циркулююче аутоантитіло і специфічне антитіло, ферментно-пов'язане. У цій процедурі іммобілізація відбувається під час тесту на поверхні лунки мікропланшета при взаємодії стрептавідину, нанесеного в лунку і додавання ззовні антигену біотинильованого Н.Pylori. При змішуванні біотинильованого антигену і сироватки, що містить аутоантитіла, відбувається реакція між антигеном і антитілом з утворенням імунного комплексу. Взаємодія описується наступним рівнянням:



$B^{tn}Ag_{(H.PYLORI)}$  = Біотинильований антиген (постійна кількість)

$h-Ab_{(X-H.PYLORI)}$  = аутоантитіло людини (змінна кількість)

$Ab_{(X-H.PYLORI)} - B^{tn}Ag_{(H.PYLORI)}$  = імунний комплекс (змінна кількість)

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

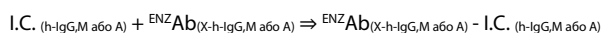
Одночасно комплекс осідає в лунці завдяки реакції високої спорідненості між стрептавідином і біотинильованим антигеном. Ця взаємодія показана нижче:

$h-Ab_{(X-H.PYLORI)} - B^{tn}Ag_{(H.PYLORI)} + \text{Стрептавідин}_{CW} = \text{іммобілізований комплекс}$

Стрептавідин<sub>CW</sub> = Стрептавідин, іммобілізований в лунках

Іммобілізований комплекс = сандвіч-комплекс, пов'язаний з твердою поверхнею.

Після інкубації лунки добре промивають, щоб відокремити незв'язані компоненти шляхом аспірації та/або декантаци. Ферментно-пов'язані виділені специфічні антитіла (анти- $h-IgG$ ,  $M$  або  $A$ ) потім додають в лунки. Ці кон'югати зв'язуються з утвореним імунним комплексом.



$I.C. (h-IgG_M \text{ або } A)$  = Іммобілізований імунний комплекс (змінна величина)

$ENZAb_{(X-h-IgG_M \text{ або } A)}$  = кон'югат фермент-антитіло (постійна величина)

$ENZAb_{(X-h-IgG_M \text{ або } A)} - I.C. (h-IgG_M \text{ або } A)$  =  $Ag-Ab$  комплекс (змінна величина)

Ферментний кон'югат анти- $h-IgG$ ,  $IgM$  або  $IgA$ , який зв'язується з імунним комплексом при другій інкубації, відділяється від матеріалу, який не зреагував, на стадії промивки. Активність ферменту в цій фракції прямо пропорційна концентрації антитіл в зразок. Використовуючи декілька різних

референтних сироваток з відомою активністю антитіл, будується калібрувальна крива, з якої визначається активність невідомого антитіла.

### 4. РЕАГЕНТИ

**Матеріали, що постачаються:**

#### A. Калібратори Анти-Н.PYLORI - 1 мл/флакон

5 флаконів референтної сироватки для анти-Н.PYLORI з концентраціями 0 (A), 10 (B), 25 (C), 50 (D) і 100 (E) Од/мл\* IgG, IgM або IgA типів. Зберігати при 2-8 °C. Містять консерванти. \*Референтне значення виробника.

**Примітка:** Калібратори на основі людської сироватки були відкалібровані при використанні 1-ого Міжнародного еталонного препарату, який аналізували відносно Стандарту 66/387 Ради з медичних досліджень (MRC) для антитиреоїдної мікросомії.

#### B. Біотиновий Реагент Н.PYLORI - 13 мл/флакон

Один (1) флакон біотинильованого інактивованого Н.PYLORI (IgG, IgM або IgA), стабілізованого в буферній матриці. Містить консервант. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### C. Ферментний реагент анти-Н.PYLORI - 13 мл/флакон

Один (1) флакон кон'югату анти- $h-IgG$ ,  $IgM$  або  $IgA$ -пероксидаза хрому (HRP), стабілізованого в буферній матриці. Консервант був доданий. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### D. Планшет, покритий Стрептавідином - 96 лункок

Один 96-лунковий мікропланшет, покритий Стрептавідином і запакований в алюмінієву фольгу з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C.

#### E. Розчинник сироватки - 20 мл

Один (1) флакон концентрату розчинника сироватки, який містить буферні солі і барвник. Зберігати при температурі 2-8 °C.

#### F. Концентрат розчину для промивання - 20 мл/флакон

Один флакон, що містить сурфактант в фосфатному сольовому буфері. Містить консервант. Зберігати при 2-8 °C.

#### G. Субстрат А - 7 мл/флакон

Один флакон, що містить ТМБ в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

#### H. Субстрат В - 7 мл/флакон

Один флакон, що містить перекис водню в буфері. Зберігати при 2-8 °C.

#### I. Стоп-розчин - 8 мл/флакон

Один флакон, що містить сильну кислоту (1N HCl). Зберігати при 2-8 °C.

#### J. Інструкція

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти після закінчення терміну придатності.

**Зауваження 2:** Уникати впливу тепла і світла. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C. Стабільність набору і компонентів вказана на етикетці.

**Зауваження 3:** Всі реагенти призначені для формату одного планшета.

### 4.1 Необхідні матеріали, які не постачаються з набором

1. Мікродозатори на 10, 25 і 50 мкл з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсери на 100 і 350 мкл з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або гнучка бутылка (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм і 620 нм.
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикова плівка або кришка для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

### 5. ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений для діагностики in-vitro**

**Не для внутрішнього або зовнішнього використання на людях або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, HCV і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з біобезпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, "2nd Edition, 1988, NHS.

**Безпечна утилізація компонентів набору повинна проводитись у відповідності з місцевими нормативно-законодавчими вимогами.**

## 6. ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками мають бути кров, сироватка або плазма, дотримуватися звичайних застережних заходів при зборі зразків крові методом венепункції. Для порівняння нормальних значень повинна бути отримана ранкова сироватка (натще). Кров слід збирати в пробірки з червоним маркуванням без добавок або антикоагулянтів. Дозвольте крові згорнутися. Для відділення сироватки використовуйте центрифугу.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані за цей час, вони можуть бути заморожені до -20 °C на період до 30 днів. Уникайте повторних циклів заморожування - відтавання. Для аналізу в дублях вимагається 0.100 мл (IgM & IgA) або 0.050 мл (IgG) розведеного зразка.

## 7. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна перевіряти контролі на рівнях в низькому, середньому і високому діапазоні для моніторингу проведення тесту. Ці контролі повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Розріджувач сироватки

Розвести розріджувач сироватки до 200 мл в підходящому контейнері дистильованою або деіонізованою водою. Зберігати при температурі 2-8 °C.

### 2. Промивний буфер

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл дистильованою або деіонізованою водою. Зберігати при кімнатній температурі (2-30 °C) до 60 днів.

### 3. Робочий Субстратний розчин

Змішайте Субстрати, виливши вміст бурштинового флакона з Субстратом А у прозорий флакон з Субстратом В. Закрийте прозорий флакон жовтою кришкою для легкої ідентифікації. Перемішайте суміш і підпишіть відповідно. Розчин зберігається при 2-8 °C.

### 4. Розведення Зразка Пацієнта (1/100)

Додати 0.010 мл (10 мкл) кожного зразка пацієнта до 1 мл розріджувача сироватки. Накрити кришкою і змішати на вортексі або ретельно перемішати перевертанням. Зберігати при температурі 2-8 °C протягом до сорока восьми (48) годин.

**Зауваження 1: Не використовуйте робочий субстрат, якщо він придбав блакитне забарвлення.**

**Зауваження 2: Не використовувати забруднені реагенти, або реагенти, де спостерігається ріст бактерії.**

## 9. ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контролі повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C).

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контролів для постановки в дублях. **Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігати при 2-8 °C.**
- Внесіть 0.025 мл (25 мкл) відповідного стандарту сироватки, контролю або розбавленого зразка пацієнта у відповідні лунки для визначення IgG. Для IgM або IgA піпетувати 0.050 мл (50 мкл) відповідного стандарту сироватки, контролю або розведених зразків пацієнтів у відповідні лунки.
- Додайте 0.100 мл (100 мкл) Розчину Біотинового Реагенту H.PYLORI.
- Струшуйте мікропланшет обережно протягом 20-30 секунд для перемішування та накрийте його.
- Інкубувати протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). **Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується гнучка бутылка, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок). Видаліть вміст і повторіть ще 2 рази.**
- Додайте по 100 мкл Ферментного реагенту H.PYLORI у кожен лунку. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з**

**однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

## НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ ФЕРМЕНТУ

- Накрити і інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Повторіть кроки (6 & 7), як описано вище.
- Додайте по 100 мкл Робочого розчину субстрату в кожен лунку (див. "Приготування реагентів"). **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**

## НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. **Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.**
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). **Виміри повинні бути проведені протягом 30 хвилин після додавання стоп-розчину.**

**Примітка:** Для повторного аналізу зразків з концентрацією більше 100 Од/мл розбавити зразок додатково 1:5 або 1:10 за допомогою оригінального матеріалу для розведення. Помножити на коефіцієнт розбавлення для отримання концентрації зразка.

## 10. РЕЗУЛЬТАТИ

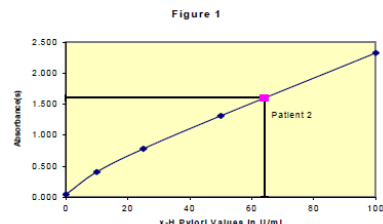
Для визначення концентрації *анти-H.PYLORI* в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації H.PYLORI в Од/мл (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Визначте концентрації H.PYLORI в кон.H.Pylogіях і зразках, використовуючи калібрувальну криву і середні значення оптичної щільності для кожного зразка. У наведеному нижче прикладі середня абсорбція 1.603 перетинає стандартну криву при 64.0 Од/мл (див. мал.1)

Приклад 1

Взорець	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація Од/мл
Калібратор А	A1	0.042	0.044	0
	B1	0.046		
Калібратор В	C1	0.424	0.406	10
	D1	0.388		
Калібратор С	E1	0.810	0.791	25
	F1	0.772		
Калібратор D	G1	1.351	1.312	50
	H1	1.273		
Калібратор E	A2	2.377	2.328	100
	B2	2.279		
Пацієнт 1	C2	0.163	0.172	5.2
	D2	0.182		
Пацієнт 2	A3	1.534	1.603	64.0
	B3	1.671		

\* Дані наведені в прикладі 1 тільки для ілюстрації і не повинні використовуватися для побудови стандартної кривої.



## 11. ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

1. Максимальна ОЩ (калібратора 100 Од/мл) повинна бути  $\geq 1.3$ .
2. Крива Реакції Дози (перетин 80%, 50% і 20%) повинна бути в межах, встановлених параметрів.
3. Чотири з шести контролів якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12. АНАЛІЗ РИЗИКІВ

### 12.1. Якість роботи набору

1. Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.
2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реактиви з різних партій.
9. Дуже висока концентрація анти-Н.PYLORI в зразках пацієнтів може забруднити зразки відразу ж після цих екстремальних рівнів. Погані дублі вказують на перехресне забруднення. Повторіть аналіз будь-якого зразка, який має ОЩ більше 3.0 одиниць.
10. Зразки пацієнтів з концентрацією вище 100 Од/мл можуть бути розведені (1/5 або 1/10) більше, ніж початкове 1/100 розведення сироватки з використанням розчинника. Концентрація зразка отримується шляхом множення результату на коефіцієнт розведення.
11. Мікробіологічно забруднені зразки не повинні використовуватися.
12. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
13. Дотримуватися всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
14. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
15. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

### 12.2 Інтерпретація результатів

1. **Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим або навченим професіоналом.**
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитися в межах встановлених норм.
4. Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.
5. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилятися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.
6. Клінічні результати повинні бути використані в оцінці можливої наявності захворювання шлунково-кишкового тракту. Проте клінічні висновки не повинні бути виключно на основі цього тесту, а як доповнення до клінічних аналізів пацієнта та інших відповідних досліджень.

## 13. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дослідження очевидно здорового населення (n=118) і хворих, що страждають від шлункових порушень (n=154) було проведено, щоб визначити очікувані значення для Anti-H. Pylori Accubind™ ІФА тест-системи. Грунтуючись на даних, були встановлені наступні значення Cut-off/

ТАБЛИЦЯ 1

	(CONC)
IgG	> 20 U/mL
IgA	> 20 U/mL
IgM	> 40 U/mL

Важливо мати на увазі, що створення очікуваного діапазону значень для нормального населення залежить від безлічі факторів: специфічності методу, населення і точності методу в руках оператора. З цих причин кожна лабораторія повинна орієнтуватися на діапазон очікуваних значень, встановлених виробником, тільки доти, доки на буде визначено власний діапазон.

## 14. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

### 14.1 Точність

Точність набору Н.PYLORI всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток двох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення ( $\delta$ ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях нижче.

#### 14.1.1 Точність Антн-Н.Pylori - IgG

ТАБЛИЦЯ 2

Точність в аналізі (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	20	5.5	0.31	5.6
Позитивний	20	43.2	1.85	4.3

ТАБЛИЦЯ 3

Точність між аналізами\* (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	10	5.8	0.40	6.9
Позитивний	10	42.1	2.10	5.0

\*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

#### 14.1.2 Точність Антн-Н.Pylori - IgM

ТАБЛИЦЯ 4

Точність в аналізі (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	20	3.1	0.23	7.4
Позитивний	20	39.8	1.65	4.1

ТАБЛИЦЯ 5

Точність між аналізами\* (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	10	3.8	0.34	8.9
Позитивний	10	37.1	2.80	7.5

\*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

#### 14.1.3 Точність Антн-Н.Pylori - IgA

ТАБЛИЦЯ 6

Точність в аналізі (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	20	2.8	0.22	8.5
Позитивний	20	25.5	1.35	5.3

ТАБЛИЦЯ 7

Точність між аналізами\* (Од/мл)

Взорець	N	x	$\sigma$	C.V., %
Негативний	10	2.5	0.20	8.0
Позитивний	10	25.1	1.90	7.6

\*вимірювання проводились в 10 експериментах в дублях.

### 14.2 Чутливість

Чутливість (межа виявлення) оцінювалася визначенням варіабельності калібратора "0" Од/мл і за допомогою  $2\sigma$  (95% точності) для розрахунку мінімальної дози:

Тест-система IgG AccuBind™ ІФА має чутливість 0.1424 Од/мл.

Тест-система IgM AccuBind™ ІФА має чутливість 0.065 Од/мл.

Тест-система IgA AccuBind™ ІФА має чутливість 0.304 Од/мл.

Спосіб боротьби з Н.pylori AccuBind™ ІФА порівняно зі способом довідкового ELISA. Біологічні зразки з різними концентраціями аналізували.



Monobind, Inc.  
100 North Pointe Drive  
Lake Forest, CA 92630

Tel: 949.951.2665 Fax: 949.951.3539 [www.monobind.com](http://www.monobind.com)



**УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ»  
вул. Чорновола, 97  
м. Івано-Франківськ, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

