



Набор ИФА для определения антител класса IgG к высокоантигенному протеину CagA

Кат. номер : EIA-4138
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 09-2008

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

1. НАЗВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

DRG CagA IgG ELISA является набором ИФА для количественного определения анти-CagA антител класса IgG в человеческой сыворотке или плазме.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ IN VITRO

3. ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Это набор основан на методе иммуноферментного анализа (ИФА), где пероксидаза хрена используется как ферментный конъюгат. В течение первой инкубации, антитела класса IgG образца анти-CagA, при их наличии, связываются с антигеном анти-CagA, нанесенным на лунки. В цикле промывки удаляется весь свободный материал. В последующей инкубации второе антитело (анти-человеческий IgG, соединенный с пероксидазой хрена) связывается с комплексом CagA-антиген-антитело. После следующего промывочного цикла в лунки добавляется бесцветный раствор хромогена (ТМБ) в субстратном буфере, где образуется цветное вещество путем реакции с ферментом пероксидазы. Развитие цвета останавливается добавлением H₂SO₄. Интенсивность цвета, измеряемая на спектрофотометре при 450 нм и 405 нм, будет таким образом прямо пропорциональна концентрации антител класса IgG к анти-CagA в стандартах и образцах.

4. РЕАГЕНТЫ, ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ: ПОДГОТОВКА 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.

Реагенты	Кол-во	Подготовка и хранение
Покрытый микропланшет: покрытый антигеном CagA (полученного путем рекомбинантной ДНК).	96 делимых лунок	Храните неиспользованные лунки при 2-8°C в герметически закрытым полиэтиленовом мешочке.
Стандарты: 6 флаконов анти-CagA IgG в основе сыворотки следующих концентраций: 0, 15, 30, 60, 120 и 240 PE/мл. Красочный цвета. Консервант: NaN ₃ (< 0.1%).	6 x 1.5 мл	Готовый к использованию
Промывочный раствор (конц.): 1 флакон of PBS-Tween 20. Консервант: тимеросал (< 0.05%). Непосредственно перед использованием разведите дистиллированной водой необходимый объем 1:20. В случае нерастворимых кристаллов перерастворите раствор, положив флакон на несколько минут при 37°C.	1 x 50 мл	Концентрат; Храните разведенный промывочный раствор 30 при 2-8°C.
Разбавитель образца (конц.): 1 флакон в основе сыворотки со стабилизаторами, красного цвета. Консервант: NaN ₃ (< 0.1%). Непосредственно перед использованием разбавьте 1:20 предварительно разведенным промывочным раствором (п. 2).	1 x 20 мл	Концентрат; Храните разведенный зазбавитель образца 30 дней при 2-8°C.
Хромоген: 2 флакона тетраметилбензидина (ТМБ) с цитрат-фосфатным буфером и DMSO.	2 x 15 мл	Liquid

Блокирующий реагент: 1 флакон 1N H ₂ SO ₄ .	1 x 14 мл	Ready for use.
Липкая пленка для планшета		
Полиэтиленовый мешочек		

5. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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

4.2 Автоматический анализ

- Данный анализ может проводится 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.

6. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ЗАМЕЧАНИЯ

Для получения правильных и воспроизводимых результатов, необходимо соблюдать следующие правила:

- Не смешивайте специфичные реагенты из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов 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 содержащей 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. Нелостаточная 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 реагенты содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание нагромождения взрывчатых азидов металлов свинцовой или медной водопроводной системе, реагенты утилизируются смыванием в раковину большим количеством воды.

7. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Анализ можно проводить с образцами сыворотки или плазмы. Высоко 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.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- приведите все реагенты к комнатной температуре.
 - переворачивая образец, смешайте его перед использованием.
1. Приготовьте лунки для бланка. Стандартов и образцов.
 2. Раскапайте в соответствующие лунки по **100 мкл** стандартов и предварительно разбавленных образцов.
Примечание: контроли не должны разбавляться.
 3. Раскапайте **100 мкл** разбавителя образца в лунку бланка.
 4. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **60+/-5 минут при 37+/-2°C**.
 5. Промойте лунки **4 раза 350 мкл** разбавленного промывочного раствора. Проведите аспирацию жидкости из лунок.
 6. Добавьте во все лунки **100 мкл** ферментного конъюгата.
 7. Накройте микропланшет самоклеющейся пленкой (поставляемой в наборе) и инкубируйте лунки в течении **30+/-2 минут при 37+/-2°C**.
 8. Промойте лунки как описано в п 5.
 9. Раскапайте **100 мкл** хромогена во все лунки.
 10. Инкубируйте лунки **15 минут при 37+/-2°C**. Избегайте попадания прямого солнечного света.
 11. Раскапайте **100 мкл** блокирующего реагента во все лунки.
 12. Считайте ОП желателно бихроматичным спектрофотометром при **450 нм** с референтной длиной волны 620 нм (обнулив аппарат лункой бланка) в течении **15 минут** после завершения анализа.

8.1 СХЕМА АНАЛИЗА (см. стр. 9 в оригинале инструкции).

9. ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На линейной графопостроительной бумаге нарисуйте калибровочную кривую, откладывая концентрации стандартов (ось x) против абсорбций, полученных от каждого стандарта (ось y). Соответствующие концентрации анти-CagA в РЕ/мл получены путем интерполяции на калибровочной кривой абсорбции каждого образца.

- Образцы со значениями IgG **менее чем 10 РЕ/мл** должны считаться **нерактивными** к антителам анти-CagA.
- Образцы со значениями IgG **от 10 до 15 РЕ/мл** должны считаться **слабо реактивными**.
- Образцы со значениями IgG **более чем 15 РЕ/мл** должны считаться **реактивными** к антителам анти-CagA.

9.1 Пример вычисления

Данные значения должны приниматься как пример и не должны использоваться вместо экспериментальных значений.

Описание		Абсорбция 450 нм	Анти-CagA IgG
Стандарт	0 РЕ/мл	0.030	
Стандарт	15 РЕ/мл	0.225	
Стандарт	30 РЕ/мл	0.430	
Стандарт	60 РЕ/мл	0.815	
Стандарт	120 РЕ/мл	1.540	
Стандарт	240 РЕ/мл	2.210	
Образец		0.935	70 РЕ/мл

При интерполяции на калибровочной кривой титр образца анти-CagA составил 70 РЕ/мл.

9.2 Критерии оценки

Перед началом вычисления результатов убедитесь, что контрольные абсорбции находятся в следующих пределах:

Описание	Ожидаемые значения
Отрицательный контроль	< 0.100
ОП кал. 240 РЕ/мл / ОП кал. 15 РЕ/мл	> 2.5
ОП кал. 15 РЕ/мл / ОП кал. 0 РЕ/мл	> 3.5

Если полученные значения вне ожидаемого диапазона, необходимо будет повторить анализ.

9.3 Интерпретация результатов

Реактивные и/или сомнительные образцы считаются положительными к антителам анти-CagA, таким образом указывая, что пациент инфицирован CagA-положительным штаммом *H. Pylori*. Нерактивные образцы считаются негативными к анти-CagA антителам, указывающие, что пациент либо не является инфицированным, или все же инфицирован CagA-отрицательным штаммом *H. Pylori*.

10. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

10.1 Диагностическая специфичность

Была определена методом вестерн-блоттинга на панели проверенных отрицательных сывороток к антителам класса IgG к анти-CagA. Результат составил 100%.

10.2 Диагностическая чувствительность

Была определена методом вестерн-блоттинга на панели проверенных положительных сывороток к антителам класса IgG к анти-CagA. Результат составил 93.7%.

10.3 Точность

Точность была оценена на вариабельности в анализе и между ними на основании 3 образцов при разных концентрациях антител класса IgG к анти-CagA.

10.3.1 В анализе

Сыворотка	Средн.	± (ДЕ/мл)	СО	КВ %	Репликации, к-во
a	37,9	±	4,0	10,6	10
b	85,6	±	8,5	10	10
c	172,6	±	11,2	6,5	10

10.3.2 Между анализами

Сыворотка	Средн.	± (ДЕ/мл)	СО	КВ %	Репликации, к-во
a	42,9	±	3,5	8,3	10
b	87,4	±	7,5	8,6	10
c	171,5	±	17,2	10	10

11. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Анализ считается серологическим исследованием на определение специфических антител класса IgG к анти-CagA. Диагноз гастрита и язвенной болезни должен быть установлен определенной клинической оценкой и дальнейшими диагностическими исследованиями. После уничтожения *H. Pylori* специфические антитела (включая анти-CagA IgG) продолжают циркулировать несколько месяцев. Поэтому, исследование может показать положительные результаты даже пациентов, в которых инфекция была полностью устранена соответствующим лечением.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005, а/я 742

Тел.: (0342) 775122; Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.com