

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО HELICOBACTER PYLORI

HP IgM

Кат. №: **HPM.CE**

Дата випуску інструкції: **11-2019**

Версія: **3**



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл IgM до Helicobacter pylori в сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл IgM до Helicobacter pylori в плазмі та сироватці людини. Тільки для діагностики in vitro.

В. ВСТУП

Helicobacter Pylori (Hr) - грамнегативна бактерія, вперше виділена в слизовій оболонці шлунка Маршаллом і Уорреном у 1983 році.

Було визнано, що Hr є агентом, відповідальним за більшість випадків пошкодження слизової оболонки шлунка, і відіграє роль у еволюції захворювань шлунка до карциноми.

Hr викликає імунну відповідь під час інфекції, і пацієнт виробляє специфічні антитіла різних класів IgG, IgA та IgM.

В даний час ІФА використовується для скринінгу пацієнтів, уражених гастритом або пептичними виразками, на гостру активну інфекцію, спричинену деякими вірулентними штамами Helicobacter Pylori.

Зокрема, повідомляється, що наявність антитіл IgA та IgM корелює з гострою фазою захворювання, тоді як антитіла IgG з'являються в різних титрах незабаром після первинних інфекцій і зберігаються в крові протягом багатьох років.

Кількісний ІФА також використовується для спостереження за пацієнтами, які проходять антибіотикотерапію, що корисно для моніторингу коливань титру IgG під час та після фармацевтичного лікування.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті імунодомінантними антигенами H. Pylori, отриманими з культури тканин вірулентного штаму.

Під час 1-ї інкубації тверду фазу обробляють розведеними зразками, і анти-HP IgM захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти-HP IgM виявляються шляхом додавання антитіла до hlgM, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл анти-HP IgM, присутніх у зразку.

Таким чином, наявність IgM у зразку можна визначити за допомогою граничного значення cut-off, здатного розрізнити негативні та позитивні зразки.

Нейтралізація анти-HP IgM і ревматоїдного фактора, що проводиться безпосередньо в лунці, виконується в аналізі з метою блокування такого роду інтерференцій при визначенні IgM.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для виконання 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок x 8 відривних лунок, покритих специфічними імунодомінантними антигенами HP, отриманими з культури тканин вірулентного штаму. Пластину запечатану в пакет з осушувачем.

Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітисся до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Негативний контроль: CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить антитіла IgM людини, негативні до HP, 2% казеїну, 10 mM (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль має блідо-жовтий колір.

3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить антитіла IgM людини з високим титром, позитивні до HP, 2% казеїну, 10 mM (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль кодується зелено-жовтим кольором.

4. Калібратор: CAL

X1 флакон. Ліофілізований реагент розчиняють водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, низький титр людських антитіл IgM до HP, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.

5. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle). 20X концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 mM (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

6. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання, кодований червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до IgM людини, 5% BSA, 10 mM (mM) Tris-буфер pH 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфат як консерванти.

7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 mM (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетра-метилбензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

8. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄. Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

9. Розчинник для зразків: DILSPE

2x60 мл/флакон (ml/vial). Містить 2% казеїну, 10 mM (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Використовується для розведення зразка.

10. Нейтралізуючий реагент: SOLN NTR

1x8 мл/флакон (ml/vial). Містить козячі анти-hlgM, 2% казеїну, 10 mM (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

11. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

12. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (100 мкл (μl) та 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА, встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 nm (nm) (зчитування) та з 620-630 nm (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Захищайте Хромоген (ТМВ) від сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенда, де проводиться тест.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контрольів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контрольів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.

2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування, коли набір використовується для скринінгу одиниць крові.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вибрані з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Негативний контроль:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Позитивний контроль:

Готовий до використання компонент. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Калібратор:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Розчинений калібратор не стабільний. Зберігати в замороженому вигляді в аликвотах при -20 °C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20x бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2...8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Розчинник зразка:

Готовий до використання. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання компонент. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні Н-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні Р-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

І. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

- Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%.
- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
- Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
- Час інкубації** має допуск +/- 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (а) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
- При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати

значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

- Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
- Переконайтеся, що Хромоген (ТМВ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
- Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розчиніть вміст Калібратора, як описано вище.
- Розведіть весь вміст 20x концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
- Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
- Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

- Розведіть зразки 1:101 у правильно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) Розчинника зразка + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте Контролі/Калібратор, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку А1 порожньою для операції бланкування.
- Внесіть 50 мкл (μl) Нейтралізуючого реагенту (SOLN NTR) у всі лунки за винятком А1, що використовується для бланкування, і в лунки, що використовуються для Контролів та Калібратора.

Важлива примітка: Нейтралізуючий реагент здатний блокувати хибнопозитивні реакції через RF. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були позитивні при аналізі IVD, який не здійснює жодної реакції блокування RF.

- Внесіть 100 мкл (μl) Негативного Контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) Позитивного Контролю в одному екземплярі, 100 мкл (μl) Калібратора в дублях і 100 мкл (μl) розведених зразків у кожному правильно ідентифіковану лунку.

5. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклеєні клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

6. Промийте мікропланшет з автоматичним вошером внесенням та аспірацією 300 мкл (μl)/лунку розведеного промивного розчину, як описано в розділі І.3.
7. Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в усі лунки, окрім лунки А1 та накрийте планшет. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, крім А1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Ферментним Кон'югатом. Може відбутися забруднення.

8. Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хвилин**.
9. Промийте мікролунки, як описано в кроці 6.
10. У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку для бланкування. Перевірте, чи правильно додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C) протягом 20 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

11. Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори, контрольну сироватку і позитивні зразки з синього на жовтий.
12. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину як описано в розділі І.5, за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язкове), бланкуючи прилад на А1.

Важливі загальні зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Нейтралізуючий реагент (лише для зразків)	50 мкл (μl)
Калібратор(*) та Контролі	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хвилин
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
TNB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хвилин
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-Off, тому він не впливає на обчислення результатів тесту.
- Калібратор (CAL) використовується тільки в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 2											
B	NC	S 3											
C	NC	S 4											
D	NC	S 5											
E	CAL(*)	S 6											
F	CAL(*)	S 7											
G	PC	S 8											
H	S 1	S 9											

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний контроль PC = Позитивний контроль S = Зразок CAL(*) = Калібратор – не обов'язково

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням та вимогам директиви IVDD 98/79/EC. Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення OD450 нм (nm)
Негативний контроль	< 0.150 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%
Позитивний контроль	OD450 нм (nm) > 0.500

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 OD450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль > 0.150 OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний м'який розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Позитивний контроль < 1.000 OD450 нм (nm)	1. чи процедура була правильно виконана; 2. що жодної помилки не було зроблено в розподілі контролів (видача негативного контролю замість позитивного контролю. У цьому випадку негативний контроль також матиме значення OD450 нм (nm) > 0.150; 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо такі проблеми виникають, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

**** Примітка:**

Якщо використовувалася Калібратор, перевірте такі дані:

Проблема	Перевірити
Калібратор	S/Co > 1.0

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, дійте наступним чином:

Проблема	Перевірити
Калібратор S/Co < 1.0	<ol style="list-style-type: none"> чи процедура була правильно виконана; чи під час внесення не сталася помилка (внесення неправильного контролю); чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; чи не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, Негативний Контроль, Позитивний Контроль) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

P. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, результати розраховуються на основі середнього значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Негативного Контролю (NC) за допомогою граничного значення (Co), визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

Важлива примітка: Коли розрахунок результатів виконується операційною системою автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для розрахунку граничного значення та правильної інтерпретації результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка і граничного значення Cut-off (Co), або S/Co, відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 – 1.2	Двозначний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат свідчить про відсутність у пацієнта антитіл IgM до H.pylori.

Будь-якого пацієнта, який показує неоднозначний результат, слід повторно перевірити на другому зразку, взятому через 1-2 тижні після першого зразка.

Позитивний результат свідчить про триваючу інфекцію H.pylori, тому пацієнта слід лікувати відповідно.

Важливі примітки:

- Самих лише результатів IgM H.pylori недостатньо для встановлення чіткого діагнозу інфекції Helicobacter pylori. Необхідно провести інші тести на Helicobacter Pylori (постачаються Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. під кат. № HPA.G.CE, HPA.CE та HPG.CE).
- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз повинен поставлений і переданий пацієнту лікарем з відповідною кваліфікацією.

Нижче наведено приклад розрахунку.

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль: 0.100 – 0.120 – 0.080 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.100 OD450 нм (nm)
Нижче 0.150 – Приймається

Позитивний контроль: 1.000 OD450 нм (nm)
Більше 0.500 – Приймається

Cut-off = 0.100+0.250 = 0.350

Калібратор: 0.500 – 0.540 OD450 нм (nm)
Середнє значення: 0.520 OD450 нм (nm)
S/Co вище 1.0 – Приймається

Зразок 1: 0.080 OD450 нм (nm)
Зразок 2: 1.800 OD450 нм (nm)
Зразок 1 S/Co < 1.0 = негативний
Зразок 2 S/Co > 1.2 = позитивний

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється в Основних вимогах Директиви 98/79/EC.

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл HP IgM.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий від пацієнта з анамнезом інфекції мононуклеозу, щоб забезпечити постійну та чудову чутливість пристрою.

2. Діагностичні специфічність та чутливість

Діагностичні показники оцінювалися на зразках, наданих зовнішнім центром, з чудовим досвідом діагностики інфекційних захворювань.

Діагностичну чутливість досліджували на більш ніж 50 зразках, попередньо позитивних з референсним набором європейського походження, що використовується в лабораторії. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів із клінічною історією інфекції H.pylori.

Діагностична специфічність була визначена на панелях із понад 100 негативних зразків від нормальних осіб і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору, включаючи зразки, які можуть інтерферувати.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були перевірені, щоб визначити, чи заморожування зразків перешкоджає виконанню тесту.

На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалось.

Оцінка ефективності надала такі значення:

Чутливість	> 98 %
Специфічність	> 98 %

3. Відтворюваність

Цей показник був розрахований на трьох зразках, досліджених у повторах у різних сесіях. Значення CV%, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках з різною реактивністю HP IgM, досліджених у 16 повторах у трьох окремих сесіях, коливалися в межах 4-15%, залежно від показань OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm).

Спостережена варіабельність не призвела до неправильної класифікації зразків.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність оцінюється як менше ніж 2% від нормальної популяції.

Помічено, що заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину після розморожування, дають деякі помилкові результати.

ЛІТЕРАТУРА

- Lazzaroni M. et al.. Medicina (1989), 9, 9-18.
- Vaira D. et al.. Federazione Medica XLI (1988), 7, 549-555.
- Oderda G. Et al.. The Lancet (1989), vol.6, 7, 358-360.
- Loffeld H. et al.. The Lancet (1989) vol.6, 10, 554-556
- Vaira D. et al.. British Medical Journal (1988), vol.9, 43, 374-375.
- Oderda G. et a.. Gut (1989), vol. 30, 7, 912-916.
- Vaira D. et al.. Ital.J.Gastroenterol. (1988), 20, 299-304.
- Vaira D. et al.. Current Opinion in Gastroenterology (1989), 5, 817-823.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

*Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*

ТОВ ДІА.ПРО

*Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it*



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

*ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua*

