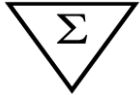


Інструкція з використання

Хелікобактер пілорі IgG ІФА



Каталожний No. E-HLG-K08



2 x 96



RD-RatioDiagnostics	Phone: + 49 (0) 69 / 7807 4942
Westerbachstraße 47	Fax: + 49 (0) 69 / 7807 4998
60489 Frankfurt	Email: info@rd-labs.com
Німеччина	www.RD-LABS.com

Уповноважений представник: ТОВ «НОВАМЕДЛАЙН», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1, тел. (044) 223-83-18,

info@novamedline.com, www.novamedline.com

ПЕРЕДБАЧУВАНЕ ВИКОРИСТАННЯ

RD-RatioDiagnostics E-HLG-K08 Хелікобактер пілорі IgG ІФА - це набір імуноферментного аналізу, що забезпечує матеріал для виявлення антитіл класу IgG до Хелікобактер пілорі бактерії в сироватці або плазмі людини. Цей аналіз призначений лише для використання in vitro.

ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ТА ПОЯСНЕННЯ

У 1983 р. Уоррен і Маршалл виявили хелікобактер пілорі, новий грамнегативний бактеріальний збудник, у пацієнтів, які страждають на гастрит, і це відкриття призвело до досліджень взаємозв'язку між бактеріальною інфекцією та хронічними захворюваннями шлунка. Було продемонстровано, що у пацієнтів з гастритом ліквідація бактерій призвела до загоєння анатомічного ураження (4).

Діагностичні процедури для виявлення організму, як правило, включають інвазивні (гастроскопічні) методи відбору зразків.

Однак специфічна імунна відповідь спостерігається у інфікованих пацієнтів. Існує відмінна кореляція між клінічним проявом гастриту, наявністю *H.pylori* у шлунку та антитілами IgG, IgM та IgA до *H.pylori* у підвищеному рівні сироватки крові. Таким чином, серологічний тест є корисною альтернативою інвазивній біоптичній техніці. Рівні IgA та IgM зростають із первинною та хронічною інфекцією та залишаються невдовзі. Отже, ефективність антимікробної терапії можна контролювати шляхом зміни специфічних антитіл IgG.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Набір E-HLG-K08 *Helicobacter pylori* IgG заснований на техніці ІФА. Під час аналізу контролю та невідомі інкубують у лунках мікропланшета, покритих очищеним та інактивованим антигеном *Helicobacter pylori*. Після інкубації та промивання лунки обробляють кон'югатом, що складається з анти-людських IgG антитіл, мічених пероксидазою. Після другого етапу інкубації та промивання лунки інкубують із субстратом тетраметилбензидином (ТМБ). Потім додають кислий зупиняючий розчин і визначають ступінь ферментативного обороту субстрату шляхом

вимірювання довжини хвилі поглинання при 450 нм. Виміряне поглинання прямо пропорційно концентрації антитіл IgG проти *Helicobacter pylori*.

РЕАГЕНТИ

Набір RD-RatioDiagnostics *Helicobacter pylori* IgG ІФА містить достатню кількість реагентів для 96 лунок. Кожен набір містить такі реактиви:

Матеріали надані	кількість	Каталожний номер
Стріпи мікропланшету, покриті антигеном Х.пілорі	Один планшет	E-HLG-10
Промивний концентрат	Одна пляшка	E-WSL-30
Розчинник зразку	Одна пляшка	E-DLB-40
ТМБ-Субстрат	Одна пляшка	E-TMB-08
Калібратор 0	Один флакон	E-HLG-01
Калібратор 1	Один флакон	E-HLG-02
Калібратор 2	Один флакон	E-HLG-03
Калібратор 3	Один флакон	E-HLG-04
Калібратор 4	Одна пляшка	E-HLG-05
2-е антитіло кон'югат	Одна пляшка	E-HLG-20
Стоп розчин	Одна пляшка	E-STP-09

МАТЕРІАЛИ НЕ НАДАНІ

- Рідер мікропланшетів, здатний вимірювати поглинання при 450 нм
- Дейонізована / дистильована вода
- Точна піпетка для подачі 10 мкл, 100 мкл і 1 мл
- Напівавтоматична піпетка для подачі 100 мкл
- Автоматичний вошер для мікропланшета
- Абсорбуючі матеріали для промокання стріпів
- Інкубатор

НАДАНІ МАТЕРІАЛИ:

Стріпи мікропланшета, покриті антигеном Хелікобактер:

Один смуготримач, що містить 12x8 (96) лунок мікропланшету, покритих антигеном Хелікобактер пілорі. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності. Вийміть тримач та стріпи, які будуть використовуватися, з упаковки з фольги та покладіть невикористані стріпи в поліетиленовий пакет з силікагелем, видаліть повітря та ущільніть, натиснувши на замок. Після відкриття продукт стабільний протягом 4 тижнів при температурі 2-8 ° С.

Концентрат для промивання:

Одна пляшка, 100 мл, що містить сольовий розчин, забуферений фосфатом, концентрований 10-кратний, що містить 0,5 %. Перед використанням розбавити деіонізованою / дистильованою водою. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Розчинник зразку:

Одна пляшка, 100 мл, що містить розчин BSA з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Хелікобактер пілорі IgG калібратори:

П'ять флаконів, кожен по 2 мл сироватки людини в 0,01 М фосфатному буфері з 0,09% азидом натрію в якості консерванту. Значення калібатора 1 являє собою пороговий контроль, значення повідомляються на етикетках флаконів. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

2-е антитіло кон'югат:

Одна пляшка, 12 мл, що містить моноклональні анти людські IgG антитіла, мічені пероксидазою, у фосфатному буферному розчині з 0,02% прокліну. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ТМБ-субстрат:

Одна пляшка, 12 мл, що містить тетраметилбензидин (ТМБ) і перекис водню, стабілізовані в цитратному буфері, рН 3,8. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

Стоп розчин:

Одна пляшка, 15 мл, що містить 0,3 М H₂SO₄ у розчині. Зберігати при температурі 2-8 ° С до закінчення терміну придатності.

ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

Для використання *in vitro*

Слід дотримуватися таких універсальних належних лабораторних практик: не їжте, не пийте, не паліть і не застосовуйте косметику там, де обробляють імунодіагностичний матеріал. Не піпетувати через рот. Одягайте лабораторні халати та одноразові рукавички під час роботи з імунодіагностичним матеріалом. Після цього ретельно вимийте руки. Закрийте робочу зону одноразовим абсорбуючим папером. Негайно витріть розлиті плями та знезаражте уражені поверхні. Уникайте утворення аерозолів. Забезпечити достатню вентиляцію. Обробляйте та утилізуйте всі реагенти та матеріали відповідно до чинних норм.

ПОПЕРЕДЖЕННЯ: ПОТЕНЦІАЛЬНИЙ БІОЛОГІЧНО НЕБЕЗПЕЧНИЙ МАТЕРІАЛ

Цей набір може містити деякі реагенти, виготовлені з матеріалом людського та тваринного походження (наприклад, сироваткою, плазмою або бичачим альбуміном) або використовуються разом із матеріалом людського та тваринного походження. Матеріал у цьому наборі був протестований методами, позначеними CE, і виявлено, що він не реагує на антитіла до ВІЛ-1/2, HCV та HbsAg; у матеріалі немає даних про зараження тваринами. Жоден доступний метод випробувань не може дати повних гарантій усунення потенційного ризику для біологічної безпеки. Обробляйте всі реагенти та зразки пацієнтів на рівні Біобезпеки 2, як рекомендується для будь-якого потенційно інфекційного людського матеріалу в Центрах контролю за захворюваннями / Посібник Національного інституту охорони здоров'я "Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях", 4-е видання, квітень 1999

ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ:

Деякі реагенти цього набору містять азид натрію як консервант у концентраціях нижче нормативної межі <0,1%. Концентрований азид натрію, хоча і значно розбавлений, подразнює шкіру та слизові оболонки і може реагувати зі свинцевим та мідним водопроводом, утворюючи

вибухонебезпечні азиди металів, особливо якщо накопичуються. Крім того, ТМБ та сірчана кислота у концентрованих кількостях також подразнюють шкіру та слизові оболонки. Ці речовини знаходяться у розведеному вигляді, і тому можуть значно мінімізувати ризики впливу, але не повністю. Забезпечити достатню вентиляцію. Уникайте контакту зі шкірою, очима та одягом. У разі контакту з будь-яким із цих реагентів ретельно промити водою та звернутися до лікаря. Утилізуйте всі небезпечні реагенти, промиваючи великими обсягами води, щоб запобігти накопиченню хімічної небезпеки в сантехнічній системі. Зразок розчинника та контролі містять розведений BSA. Для отримання додаткової інформації щодо небезпечних речовин у наборі, будь-ласка, зверніться до специфічних паспортів безпеки (SDS) за запитом.

ЗБІР ЗРАЗКІВ І ОБРОБКА

Слід використовувати сироватку та дотримуватися звичайних запобіжних заходів щодо венепункції. Зразки можна зберігати при 2-8 ° C протягом 2 днів. Триваліше зберігати при -20 ° C. Не використовуйте гемолізовані або ліпемічні зразки. Уникайте повторного заморожування та розморозування зразків.

ПІДГОТОВКА ДО АНАЛІЗУ

Для успішного використання продукту необхідне глибоке розуміння цієї інструкції. Надійні результати будуть отримані лише за допомогою точних лабораторних методів та точно слідуючи вкладеній в упаковку інструкції. Перед використанням доведіть усі реактиви та зразки до кімнатної температури (~ 25 ° C). Ретельно перемішайте реагенти та зразки перед використанням обережною інверсією. Не змішуйте різні партії будь-яких компонентів набору в рамках окремого аналізу. Не використовуйте жодних компонентів після закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці. Неповне миття негативно вплине на результат та точність аналізу. Щоб мінімізувати потенційний дрейф аналізу через зміну часу інкубації субстрату, слід подбати про додавання стоп розчину в лунки в тому ж порядку та за швидкістю для додавання розчину хромогену ТМБ. Уникайте мікробного забруднення реагентів, особливо кон'югату, промивного буфера та розріджувача. Уникайте забруднення розчину хромогену ТМБ кон'югатом. Для кожного реагенту використовуйте чистий одноразовий наконечник піпетки. Уникайте піпеток з металевими деталями. Ємності та напівавтоматичні наконечники для піпеток, що використовуються для кон'югату та ТМБ, можуть бути використані повторно за умови, що вони ретельно промиті деіонізованою / дистильованою водою та висушені до та після кожного використання. Фермент, що використовується як етикетка, інактивується киснем і є дуже чутливим до мікробного забруднення, азиду натрію, хлористоводневої кислоти та ароматичних хлорвуглеводнів, які часто містяться в лабораторних запасах води. Використовуйте високоякісну воду. Уникайте впливу реагентів надмірним теплом або сонячним світлом під час зберігання та інкубації.

ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ:

Промивний розчин:

Перед використанням розбавте 1:10 деіонізованою / дистильованою водою. Якщо присутні кристали, їх слід розчинити при температурі 37 ° C перед розведенням. Налийте 100 мл промивного концентрату в чисту ємність і розведіть, додавши 900 мл деіонізованої / дистильованої води. Ретельно перемішати шляхом інверсії. Промивний розчин стабільний протягом 5 днів при кімнатній температурі та 2 тижні при 2-8 ° C при зберіганні в щільно закупореній пляшці.

Стріпи мікропланшету:

Виберіть кількість стріпів з покриттям, необхідних для аналізу. Залишилися невикористані лунки слід помістити в пакет, що закривається, з осушувачем. Пакет потрібно закрити повторно, щоб захистити від вологи.

Процедура аналізу:

Усі зразки та реагенти перед використанням повинні досягти кімнатної температури (~25 ° C). Зразки сироватки та контролю слід аналізувати у двох примірниках.

1. Позначте стріпії мікропланету, які слід використовувати.
2. Розведіть зразки сироватки 1: 101, розподіливши 10 мкл сироватки в 1 мл розчинника для зразків.
3. Піпетуйте по 100 мкл кожного розведеного зразка сироватки та готових до використання контролів у відповідні лунки.
4. Інкубуйте протягом 45 хвилин при 37 ° C.
5. Аспіруйте і промивайте кожну лунку чотири (4) рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши планшет на абсорбуючий матеріал.

ПРИМІТКА: Настійно рекомендується використовувати автоматичний вошер для мікропланшетів. Неповне миття негативно вплине на точність аналізу. Якщо пристрій для промивання мікропланшетів відсутній,

- (a) повністю аспіруйте рідину з кожної лунки,
- (b) додавайте 0.35 мл промивного розчину в кожну лунку;
- (c) повторити кроки (a) та (b) чотири рази.
6. Додайте 100 мкл кон'югату міченого ферменту 2-е антитіло у кожну лунку.
7. Інкубуйте протягом 45 хвилин при 37 ° C.
8. Аспіруйте та промивайте кожну лунку чотири рази протягом 30 секунд промивним розчином за допомогою автоматичного вошера для мікропланшетів або вручну за допомогою дозатора. Протріть і висушіть, перевернувши планшет на абсорбуючий матеріал.
9. Додайте 100 мкл розчину хромогену ТМБ у кожну лунку за допомогою дозатора.
10. Інкубуйте 15 хвилин при кімнатній температурі. Уникайте потрапляння прямих сонячних променів.
11. Додайте 100 мкл стоп розчину в кожну лунку за допомогою дозатора.
12. Прочитайте поглинання розчину в лунках протягом 30 хвилин, використовуючи рідер мікропланшетів, встановлений на 450 нм. Якщо довжина хвилі доступна корекція, встановіть прилад на подвійне вимірювання довжини хвилі на 450 нм з фоновою корекцією довжини хвилі встановлено на 600 або 620 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ

Обчисліть середню абсорбцію для кожного контролю та невідомих.

Якісні результати:

Пороговий контроль співвідноситься з калібратором 1.

Якщо поглинання зразка вище, ніж поглинання порогове, зразок позитивний на наявність специфічного IgG. Обчисліть співвідношення між середнім значенням ОГ для зразка та значенням порогового значення.

Зразок розглядається:

Позитивний: якщо співвідношення > 1,1.

Сумнівний: якщо +/- 10% від порогового значення.

Негативний: якщо коефіцієнт < 0,9.

Якщо результат залишається сумнівним, візьміть новий зразок сироватки.

Кількісні результати:

Концентрація IgG проти *H.pylori* у кожному зразку може бути виражена в одиницях RD од / мл (од / мл), надрукованих на етикетках флаконів. Графік можна побудувати нанесенням од / мл проти середньої ОГ контролів; коли ОГ зразка відображена на графіку, можна обчислити Од / мл, що міститься у зразку сироватки. Для кожного пробігу повинна виконуватися стандартна крива.

Позитивні / негативні результати можуть бути виражені в МОд наступним чином:

Позитивний: концентрація зразка > 10 Од / мл

Негативний: концентрація зразка < 9 Од / мл

Сумнівний: концентрація зразка коливається від 9 до 10 Од / мл

ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Зразок сироватки, отриманий під час пізньої фази зараження, коли присутні лише антитіла IgG, може бути негативним за цією процедурою.
- Результати тесту слід використовувати разом із інформацією, отриманою в результаті оцінки інших клінічних та діагностичних процедур.
- Уникайте повторного заморожування та розморожування реагентів та зразків.
- Слід уникати грубо гемолізованих, жовтяничних або ліпемічних зразків.
- Слід уникати нагрівання інактивованих сироваток.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ .

Відніміть значення бланку від усіх інших показань. Значення ОГ для калібратора 1 повинні бути не менше 0,2. Калібратор 4 повинен мати ОГ як мінімум у 3 рази більше ,ніж калібратор 1.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИКОНАННЯ

1. Чутливість і специфічність

116 людських сироваток було проаналізовано за допомогою цього референтного методу *Helicabacter pylori* IgG IFA та Westernblot. З 116 зразків 46 були позитивними на наявність антитіл IgG до *H.pylori* за даними RD-RatioDiagnostics (RD-labs) IFA та Westernblot показали 46 з них як позитивні. Результати зведені нижче

	позитивний	негативний
RD-Labs	46	70
WB	45	71

2. Точність

В аналізі дослідження				
кількість повторів	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3	
16				
середнє	1.34	1.17	0.23	
СВ	0.094	0.082	0.021	
CV%	7.01	7.0	9.13	

Між аналізами дослідження				
кількість повторів 10	Сироватка 1	Сироватка 2	Сироватка 3	
середнє	0.427	0.9531	2.5731	
СВ	0.0328	0.0467	0.0814	
CV%	7.67	4.90	3.16	

Чутливість та специфічність становили відповідно 100% та 99%.

3. Вплив

Вплив ліпемічних, гемолітичних або жовтяничних сироваток не спостерігаються до концентрації 5 мг / мл гемоглобіну, 5 мг / мл тригліцеридів та 0,2 мг / мл білірубину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Marshall B.J. and Warren J.R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i, 1311 (1984).
2. Jones D.M., Lessels A.M., Eldridge J.: *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *J. Clin. Pathol.* 37: 1002 (1984).
3. Blaser M.J.: *H. pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J. Inf. Dis.* 161: 626 (1990).
4. Valle J., Seppälä K., Sipponen P., Kasunen T.U.: Disappearance of gastritis after eradication of *H. pylori*: a morphometric study. *Scand. J. Gastroenterology* 26: 1057 (1991).
5. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. *Clin. Chem.* 22: 1243 (1976).