

ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов

"ИФА-Хеликобактер IgG"

Тест-система иммуноферментная для выявления
иммуноглобулинов класса G к *Helicobacter pylori*

НАЗНАЧЕНИЕ

Выявление и определение титра видоспецифических иммуноглобулинов класса G к *Helicobacter pylori* в сыворотке (плазме) крови людей методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) при "ручной" постановке и с использованием ИФА-анализаторов.

СОСТАВ И КОМПЛЕКТАЦИЯ НАБОРА

Иммуносорбент	лизатный инактивированный очищенный антиген <i>Helicobacter pylori</i> , сорбированный на 96-луночном разборном полистироловом планшете для иммунологических реакций с плоским дном (используются "ломающиеся" стрипы)	1 планшет
	<i>допускается отдельная упаковка стрипов (по 1-4 стрипа в пакете)</i>	
Контрольный положительный образец (K ⁺)	инактивированный, содержит антитела класса G к <i>Helicobacter pylori</i> в титре 1:800; прозрачная жидкость красного цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный образец уровня среза (K ⁺ _{пор})	инактивированный; содержит антитела класса G к <i>Helicobacter pylori</i> в "пороговом" титре (1:100); прозрачная жидкость желтого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Контрольный отрицательный образец (K ⁻)	инактивированный; прозрачная жидкость зеленого цвета	1 фл. (1,2 мл)
Конъюгат	антитела овечьи против иммуноглобулинов человека класса G, меченые пероксидазой; жидкость розового цвета	1 фл. (13 мл)
Раствор для разведения образцов (PPO)	прозрачная жидкость синего цвета	1 фл. (100 мл) или 2 фл. (по 50 мл)
25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином [ФСБ-Т(x25)]	слегка опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость, возможно выпадение осадка солей белого цвета, растворяющегося при температуре 37 °C в течение 30 мин.	1 фл. (80 мл) или 2 фл. (по 40 мл)
Раствор индикаторный (PI);	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (13 мл)
Стоп-реагент	прозрачная бесцветная жидкость	1 фл. (12,5 мл)

Примечания. 1. Набор включает все реагенты, необходимые для постановки ИФА, кроме очищенной (дистиллированной или деионизированной) воды.

2. ФСБ-Т(х25), РИ, РРО, стоп-реагент – унифицированы для всех наборов ЗАО "ЭКОлаб", в которых используются указанные реагенты.

Набор может быть дополнительно укомплектован:

вспомогательными пластиковыми емкостями (4 шт.),
планшетом для предварительного разведения образцов (1 шт.),
одноразовыми наконечниками для автоматических пипеток (16 шт.),
клеякой пленкой для планшетов (4 шт.).

Компоненты набора упакованы в коробку, в коробку вложена инструкция по применению и бланк калибровочного графика.

По желанию потребителя базовая комплектация набора (число индивидуальных упаковок с реагентами и их объемы) может быть изменена

ОСНОВНЫЕ ПОТРЕБИТЕЛЬСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Базовый вариант комплектации позволяет одномоментное исследование 96 образцов, включая контрольные (на контрольные образцы используется 6 лунок, одна лунка используется для контроля уровня "бланк"). Предусмотрена возможность проведения отдельных исследований с использованием необходимого количества стрипов:

Число стрипов	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Число исследуемых образцов	1	2-9	10-17	18-25	26-33	34-41	42-49	50-57	58-65	66-73	74-81	82-89

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

При наличии в исследуемом образце антител класса G к *Helicobacter pylori*, они связываются с антигеном, сорбированным на поверхности лунок полистиролового планшета; этот комплекс, в свою очередь, связывается с конъюгатом – антителами против IgG человека, мечеными пероксидазой хрена. Образовавшийся комплекс "антиген-антитело-конъюгат" выявляется в реакции с индикаторным раствором, содержащим хромоген – тетраметилбензидин, в результате которой меняется цвет (оптическая плотность) реакционной смеси в лунке планшета; изменение регистрируется спектрофотометрически.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Аналитическая чувствительность (минимальный определяемый титр иммуноглобулинов класса G к *Helicobacter pylori*) – не более 1:25.

Коэффициент вариации ОП контрольных образцов – не более 8 %.

ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Нативная сыворотка (плазма) крови человека объемом не менее 100 мкл.

Образцы сыворотки (плазмы) крови до исследования можно хранить не более 7 сут. при температуре от 2 до 8 °C и 3 мес при температуре минус 20 °C или более низкой. Допускается только однократное замораживание-размораживание образцов. Размороженные образцы перед исследованием тщательно перемешать.

Не допускается использование для исследования образцов с повышенным содержанием липидов и (или) с признаками гемолиза, и (или) с видимым микробным проростом.

Образцы, содержащие осадок, перед анализом отцентрифугировать в течение 10-15 мин при 2500-3000 об/мин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Набор биологически безопасен, однако с исследуемыми образцами необходимо обращаться как с потенциально инфицированным материалом.

Стоп-реагент при попадании на незащищенную кожу и слизистые может вызывать химические ожоги. В случае попадания на кожу – немедленно промойте пораженный участок водой.

СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Оборудование и материалы (для "ручной" постановки)

Дозаторы пипеточные (пипетки полуавтоматические одно- и многоканальные переменного объема) для внесения реагентов в лунки планшета с погрешностью дозирования не более 5 % с наконечниками полипропиленовыми одноразовыми.

Ручные, или автоматические промыватели, или восьми- и двенадцатиканальные пипеточные дозаторы для промывания лунок планшета.

Спектрофотометр вертикального сканирования для измерения оптической плотности в лунках планшета при 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-650 нм.

Центрифуга лабораторная на 2,5-3,0 тыс. об/мин, термостат на 37°C, холодильник бытовой, фильтровальная бумага.

Вода очищенная (дистиллированная или деионизированная).

70 %-ный раствор спирта этилового и 6 %-ный раствор перекиси водорода (дез.растворы) или растворы иных дезинфектантов, разрешенных к применению СП 1.32322-08, кроме хлорсодержащих.

Приготовление рабочих растворов реагентов для ИФА

Перед работой извлечь набор из холодильника, вскрыть упаковку и выдержать все реагенты перед проведением анализа не менее 30 мин при температуре от 18 до 25 °C

Подготовка исследуемых образцов.

Возможны два способа приготовления рабочих разведений:

1 способ

По 10 мкл каждого образца смешать с 1 мл РРО (разведение 1:100), тщательно перемешать пипетированием.

2 способ

Образцы вначале развести 1:10 во вспомогательном планшете, для чего внести в его лунки по 90 мкл РРО, затем внести в них по 10 мкл исследуемых образцов, тщательно перемешать пипетированием. Рабочее разведение (1:100) готовить непосредственно в лунках иммуносорбента (см. раздел **Проведение ИФА ("ручная" постановка)**, п. 2)

Рабочие разведения образцов хранить не более 6 ч при температуре от 18 до 25 °С.

Приготовление рабочего промывочного раствора (ФСБ-Т)

При выпадении осадка солей в ФСБ-Т(х25) прогреть его при температуре 37 °С до полного растворения осадка.

При постановках с использованием ИФА-анализаторов 80 мл ФСБ-Т(х25) довести водой очищенной до 2 л.

При дробной "ручной" постановке использовать соотношения объемов ФСБ-Т(х25) и воды, указанные в табл. 1 для разного числа используемых стрипов.

Таблица 1

Реагент	Объем реагента, мл, настрипов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т(х25)	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37	40
Вода очищенная	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925	до 1000

Готовый рабочий промывочный раствор хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 14 сут.

Приготовление остальных реагентов

Иммуносорбент, контрольные образцы, РРО, конъюгат, РИ, стоп-реагент – готовы к применению.

После вскрытия упаковок неиспользованные реагенты хранить в плотно закрытых упаковках при температуре от 2 до 8°С до истечения срока годности.

Проведение ИФА

Внимание! Соблюдение указанных ниже температуры и времени инкубации планшетов на каждой стадии постановки крайне важно для получения достоверных результатов.

1. Извлечь из упаковки рамку планшета и необходимое число стрипов. Неиспользованные стрипы допускается хранить в плотно закрытом пакете с влагопоглотителем при температуре от 2 до 8 °С до истечения срока годности.

2. В лунку А1 внести 100 мкл РРО, в следующие лунки внести по 100 мкл контрольных образцов (по 2 лунки на образец), оставшиеся лунки использовать для исследуемых образцов (по 1 лунке на образец), для чего внести в них:

при первом способе приготовления рабочих разведений исследуемых образцов – по 100 мкл готовых разведений;

при втором способе приготовления рабочих разведений исследуемых образцов – вначале по 90 мкл РРО, а затем – по 10 мкл образцов, предварительно разведенных 1:10 в лунках вспомогательного планшета, тщательно перемешать пипетированием.

3. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С в защищенном от света месте.

4. С помощью промывателя удалить образцы из лунок, 4 раза промыть планшет промывочным раствором, внося в лунки 350-370 мкл раствора. При наличии

промывателя, позволяющего производить промывку в режиме "Overflow", использовать именно этот режим. По окончании промывки остатки раствора удалить из лунок, постукивая перевернутым планшетом по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге.

5. Во все лунки внести по 100 мкл конъюгата. Планшет закрыть крышкой или клейкой пленкой. Инкубировать 30 мин при температуре от 21 до 25 °С в защищенном от света месте.

6. С помощью промывателя удалить жидкость из лунок, 4 раза промыть планшет, как указано выше.

7. Во все лунки внести по 100 мкл раствора индикаторного, немедленно поместить планшет в защищенное от света место и инкубировать 10 мин при температуре от 21 до 25°С.

8. Во все лунки (в той же последовательности, с которой вносился субстратно-индикаторный раствор) внести по 100 мкл стоп-реагента, осторожно (постукиванием по планшету) перемешать содержимое лунок и не более чем через 5 мин приступить к учету результатов.

Регистрация и учет результатов

Результаты ИФА регистрировать спектрофотометрически, выводя спектрофотометр на нулевой уровень ("бланк") по лунке А1 и измеряя оптическую плотность (ОП) при двух длинах волн – 450 нм и 620-650 нм. При отсутствии референс-фильтра на 620-650 нм оптическую плотность (ОП) измерять при длине волны 450 нм.

Результаты ИФА учитываются только при следующих условиях:

ОП_{бланк} – не более 0,1;

среднее значение ОП(K⁺) – не менее 0,6;

среднее значение ОП(K⁺_{пор}) – не менее 0,20;

среднее значение ОП(K⁻) – не более 0,10,

отношение среднего значения ОП(K⁺) к среднему значению ОП(K⁺_{пор}) - не менее 1,5; в противном случае исследование необходимо повторить.

Учет результатов качественного определения

Исследуемые образцы учитывать как положительные при ОП_{обр} больше 1,1хОП(K⁺_{пор}).

Исследуемые образцы учитывать как отрицательные при ОП_{обр} меньше 0,9хОП(K⁺_{пор})

Исследуемые образцы учитывать как сомнительные при ОП_{обр} в диапазоне от 0,9хОП(K⁺_{пор}) до 1,1хОП(K⁺_{пор})

Образцы, оцененные как сомнительные, должны быть исследованы повторно. При повторном получении сомнительных результатов рекомендуется мониторинг иммунного статуса пациента для исключения неспецифических, в том числе перекрестных реакций, приводящих к сомнительным результатам.

Учет результатов полуколичественного определения

Для полуколичественного учета результатов (титр антител класса G к *Helicobacter pylori* в исследуемых образцах) построить калибровочную кривую, для

чего на стандартном бланке (вкладывается в каждый набор) по оси абсцисс (логарифмическая шкала) отложить значения титров K^+ и $K^+_{пор}$, указанные в разделе "Состав набора", а по оси ординат (пропорциональная шкала) – соответствующие им средние значения ОП, полученные в ИФА. По полученным точкам провести прямую линию.

Для оценки титра исследуемого образца на калибровочной кривой найти точку, ордината которой равна значению ОП, полученному в ИФА с этим образцом; абсцисса этой точки будет равна титру антител класса G в образце.

Если значение ОП испытуемой сыворотки превышает значения ОП(K^+), ее следует протестировать повторно в большем разведении.

ПОСТАНОВКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИФА-АНАЛИЗАТОРОВ

Подготовить прибор в соответствии с инструкцией по его эксплуатации, ввести программу анализа, соответствующую используемому набору, и провести анализ.

Диагностическая значимость и интерпретация результатов

Результаты серологического исследования могут быть использованы для постановки окончательного диагноза только с учетом данных анамнеза и клинической картины. Выявление IgG-антител при качественном исследовании требует обязательной оценки их титра и последующего наблюдения его динамики, поскольку только постоянство, нарастание или снижение этого показателя во времени может быть поставлено в соответствие с анамнезом и клинической картиной:

IgG	IgA	Интерпретация	Рекомендации
-	-	Специфические антитела не обнаружены	при подозрении на острую инфекцию рекомендуется контрольное исследование
+	+	Острая или недавняя инфекция. В случае клинических симптомов назначается лечение.	мониторинг IgG- и IgA-антител для определения динамики их титра; использование других методов диагностики, нпр. гистологическое исследование
+	-	Только IgG ответ или эндемический инфекционный титр. В случае клинических симптомов назначается лечение.	мониторинг IgG- и IgA-антител для определения динамики их титра; использование других методов диагностики, нпр. гистологическое исследование
-	+	Только IgA ответ . В случае клинических симптомов назначается лечение	мониторинг IgG- и IgA-антител для определения динамики их титра; использование других методов диагностики, нпр. гистологическое исследование

СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора – 1 год. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

ХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ

Хранение

В упаковке предприятия-изготовителя при температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается.

Транспортирование

При температуре от 2 до 8 °С. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 до 25 °С в течение 10 сут.

УСЛОВИЯ ОТПУСКА

Для учреждений здравоохранения.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу 142530 Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО "ЭКОлаб"; тел. (49643) 3-23-11, факс (49643) 3-30-93 – отдел сбыта, (49643) 3-37-30 – ОБТК и в учреждение, уполномоченное Росздравнадзором на проведение государственного контроля качества указанной продукции.

КРАТКАЯ СХЕМА ПОСТАНОВКИ ИФА

"ИФА-Хеликобактер-IgG"

Использовать только после тщательного ознакомления с инструкцией!	
Внести	в лунку А1 – 100 мкл РРО; в лунки В1, С1 – по 100 мкл К ⁺ , в лунки D1, E1 – по 100 мкл К ⁺ _{пор} , в лунки F1, G1 – по 100 мкл К ⁻ , в следующие лунки - по 100 мкл подготовленных исследуемых образцов (по 1 лунке на образец)
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Инкубация	30 мин, 21-25 °С
Промыть	4 раза промывочным раствором
Внести	по 100 мкл индикаторного раствора в каждую лунку
Инкубация	10 -15 мин, 21-25 °С
Внести	по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку
Измерить	ОП при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по лунке А1

Маӱ 2014 ȧ.