

**HELICOBACTER PYLORI IgG
ХЕЛИКОБАКТЕР ПИЛОРИ IgG - КОЛИЧЕСТВЕН****ИН ВИТРО ЕНЗИМЕН ИМУНОЛОГИЧЕН ТЕСТ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ
НА IgG АНТИТЕЛА НА ХЕЛИКОБАКТЕР ПИЛОРИ В СЕРУМ****ВЪВЕДЕНИЕ**

Проучванията са доказали, че наличието на Х. Пилори е свързано с различни гастроинтестинални болести, включително язва на дванайсетопръстника, гастритна язва, неязвена диспепсия, гастритен аденокарцином и лимфома. Организмът присъства у 95-98% от пациентите с язва на дванайсетопръстника и у 60-90% от пациентите с гастритни язви. Проучванията доказват, че премахването на организма с антимикробна терапия е свързано с изчезване на симптомите и излекуване на болестите.

Пациентите, които представят клинични симптоми, свързани с гастроинтестиналния тракт могат да бъдат диагностицирани за Х. Пилори по два метода:

(1) Чрез инвазивни техники – включително биопсия, последвана от хистологично изследване на взетите при биопсията проби или директно откриване на уреазна активност.

(2) Не-инвазивни техники – включително тестове за урея в дъха и серологични методи.

При всички изследвания на проби от биопсия могат да се получат грешки в резултат от техниката на вземане на пробата или интерференцията със заразени бактерии. Предпочитаната техника на изследване е ELISA тест за наличието на специфични IgG антитела на Х. Пилори, поради точността и простотата на този тест.

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Нситеността на получения при реакцията цвят е пропорционална на количеството специфични IgG антитела на Х. Пилори в пробата. Резултатите се отчитат от ELISA апарат като се сравняват паралелно с калибратор и контроли.

РЕАГЕНТИ

1. Purified H. Pylori antigen coated microtiter plate, 96 Wells
2. Enzyme Conjugate Reagent, 13 ml
3. Sample Diluent, 22 ml
4. H. Pylori Negative Control, <6.25 U/ml, 150 µl
5. H. Pylori standards, 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 U/ml, 150 µl всеки
6. H. Pylori Positive Control, > 100 U/ml, 150 µl
7. Wash Buffer (20x), 50 ml
8. TMB Reagent, 11 ml, готов за употреба
9. Stop solution (1N HCl), 11 ml.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Внимание: Този тест съдържа човешки материал. Източникът на този материал е тестван отрицателен за HbsAg, HIV1/2 и HCV, но никой наличен метод не може да гарантира напълно отсъствието им. Следователно третирайте всички кръвни продукти и проби като потенциално заразни. Спазвайте националните разпоредби за работа с биологично опасни материали.
2. Не използвайте реактивите след изтичане на срока на годност и не смесвайте компоненти от кутии с различен партиден номер.
3. Не използвайте реактива, ако е станал замърсен и мътен.
4. Не използвайте реактива, ако шишенцето е пукнато или повредено.
5. Веднага поставйте капачките и не разменяйте капачките на различни шишенца.
6. Всяка ямка може да се използва само веднъж.
7. Не пипетирайте с уста.
8. Разтвори съдържащи добавки или консерванти, например натриев азид не трябва да се използват при ензимни реакции.
9. Избягвайте контакт с 1N HCl – може да причини дразнене или изгаряне на кожата. В случай на контакт измийте обилно с вода и потърсете лекарска помощ, ако дразненето продължи.
10. Само за ин витро диагностична употреба.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Серумът трябва да бъде приготвен от пълна кръв посредством стандартни лабораторни техники. Тестът е приложен само за серумни проби без добавки. Пробите могат да се съхраняват в хладилник при 2-8°C до 7 дни или замразени до 6 месеца. Избягвайте повторно замразяване на пробите.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА ТЕСТА

Неотворените тестове трябва да се съхраняват при 2-8°C, с торбички поглъщащи влагата, за да се сведе до минимум излагането на влажен въздух. Отворените тестове остават стабилни до изтичане на срока на годност, ако се прибират в хладилник веднага след употреба и се съхраняват както е описано по-горе. Тестовите могат да се използват на апарат с ширина на честотната лента 10 nm или по-малка, оптична плътност 0-3 OD или повече при 450 nm дължина на вълната.

ПОДГОТОВКА НА РЕАГЕНТИТЕ

1. Поставете всички реагенти при стайна температура (18-25°C) преди употреба.

2. Разрежете 1 обем Wash Buffer (20x) с 19 обема дестилирана вода. Например, разрежете 50 ml Wash Buffer (20x) с 950 ml дестилирана вода, за да получите 1000 ml Wash Buffer (1x). Приготвеният Wash Buffer е стабилен 1 месец при 2-8 °C. Разбъркайте добре преди употреба.

ПРОЦЕДУРА

1. Поставете желан брой ямки в носача.
2. Направете разреждане 1:40 на пробите, всичките шест стандарта, отрицателната и положителната контроли като добавите 5 µl от пробата към 200 µl от Sample Diluent. Размесете добре.
3. Пипетирайте 100 µl от разредените серуми, стандарти, и контроли в съответните ямки. За реагентна сляпа проба пипетирайте 100 µl Sample Diluent в гнездо 1A. Потупайте държача, за да отстраните мехурчетата въздух от течността и размесете добре.
4. Инкубирайте при стайна температура 30 минути.
5. В края на инкубационния период отстранете течността от ямките. Измийте ямките 4 пъти с разреждения Wash Buffer (1x) и веднъж с дестилирана вода като преди всяко миене изтупвате плаката.
6. Пипетирайте 100 µl Enzyme Conjugate Reagent във всяка ямка. Размесете леко в продължение на 10 секунди.
7. Инкубирайте при стайна температура 30 минути.
8. Отстранете ензимния реагент от ямките. Измийте ямките 4 пъти с разреждения Wash Buffer (1x) и веднъж с дестилирана вода като преди всяко миене изтупвате плаката.
9. Пипетирайте 100 µl TMB реагент във всяка ямка. Леко размесете в продължение на 10 секунди.
10. Инкубирайте при стайна температура 20 минути.
11. Спрете реакцията като добавите 100 µl Stop Solution във всяка ямка, включително ямките на двете слепи проби.
12. Леко размесете в продължение на 30 секунди. *Много е важно синият цвят напълно да се превърне в жълт.*
13. Отчетете абсорбцията при 450 nm с ELISA апарат до 15 минути.

Забележка: Процедурата с миенето е от критично значение. Недостатъчното измиване може да доведе до неправилно развитие на цвета.

ИЗЧИСЛЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средната абсорбция (A_{450}) за всеки комплект референтни стандарти, контроли и проби на пациенти.
2. Конструирайте стандартна крива въз основа на средната абсорбция спрямо съответната концентрация на стандартите, като стойностите на абсорбцията се нанасят по вертикалната (y) ос, а на концентрациите – по хоризонталната (x) ос.
3. Използвайте средната стойност на абсорбцията за всяка проба, за да определите съответната концентрация на Х. Пилори IgG в U/ml от стандартната крива.

ПРИМЕР ЗА СТАНДАРТНА КРИВА

Дадената като пример стандартна крива може да служи само като илюстрация и не трябва да се използва при изчисление на неизвестни проби. Всяка лаборатория трябва да получи свои собствени данни и стандартна крива.

H. Pylori (U/ml)	A_{450}
0	0.059
6.25	0.573
12.5	0.901
25	1.450
50	1.988
100	2.591

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Прагът за нормални проби е 20 U/ml. Стойности под 20 U/ml се смятат за нормални. Стойности над 20 U/ml се смятат за положителни. Стойности над 100 U/ml трябва да бъдат изследвани повторно с по-високо разреждане, напр. 1:802 (първо с 1:41 и след това 1:20). Резултати получени след разреждане 1:802 трябва да се умножат по 20, за да се получи вярната концентрация на H. Pylori IgG.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

1. Надеждни и възпроизводими резултати ще се получат ако описаната процедура е напълно разбрана и правилно изпълнена.
2. Процедурата с миенето е от критично значение. Недостатъчно доброто измиване ще повлияе на точността и ще доведе до фалшиво високи стойности на абсорбцията.
3. Серумни проби, които са силно липемични, силно хемолизирани или мътни не трябва да се изследват с този тест.
4. Резултатите от теста трябва да се използват само като една съставна част от диагностичната процедура, при която лекарят трябва да вземе пред вид цялата налична информация.

REV:040511

Производител: BioCheck Inc., 323 Vintage Park Drive, Foster City, CA94404, USA
Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1