



Instruction for use



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ
НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
IgA АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ
Helicobacter pylori В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

«*Helicobacter pylori* IgA-ИФА»

**A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY
FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION
OF IgA ANTIBODIES TO *Helicobacter pylori*
IN HUMAN SERUM OR PLASMA**

***Helicobacter pylori* IgA EIA**

НОМЕР ПО КАТАЛОГУ REF **K119A**

ТУ № 21.20.23-1192-18619450-2018

№ РЗН 2019/8039 от 23 января 2019 г.

№ РД-23338/46804 от 20.08.2018

Антитела к ВИЧ 1,2, вирусу гепатита С и HBsAg отсутствуют
Контрольные сыворотки, входящие в состав набора, инаktivированы.



For 96 determinations / На 96 определений



Для *in vitro* диагностики



XEMA Co., Ltd.

The 9th Parkovaya str., 48

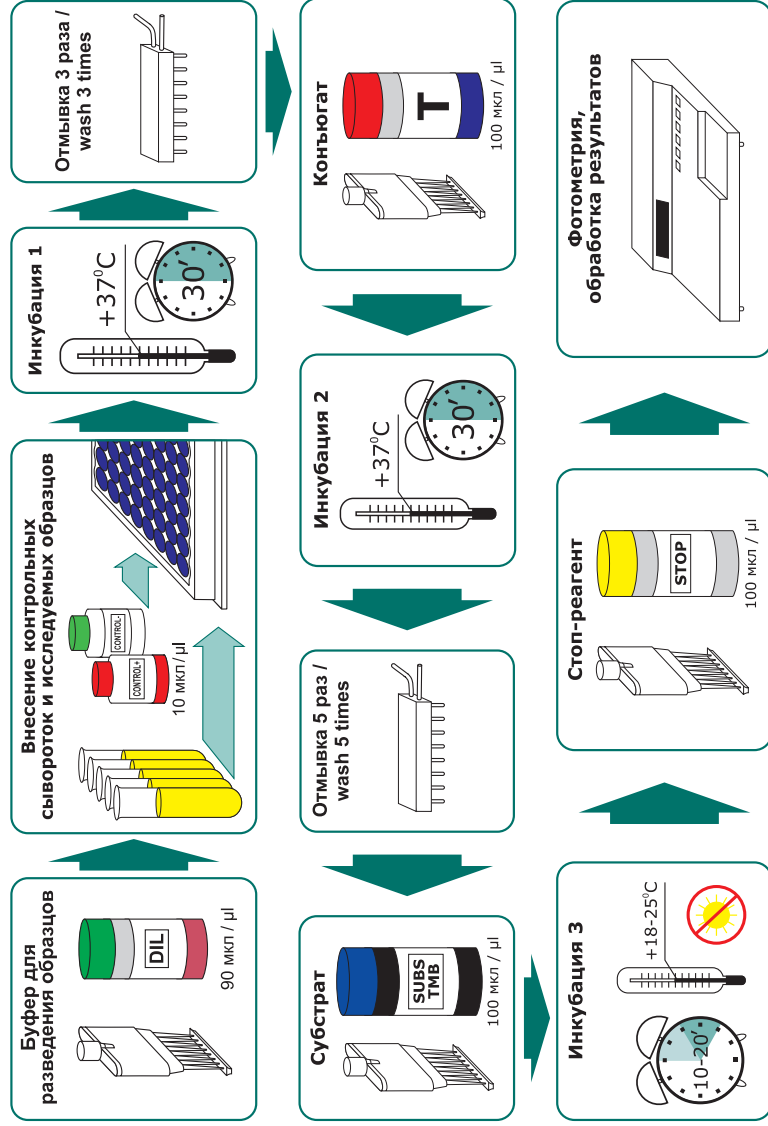
105264 Moscow, Russia

Tel./fax: +7(495) 510-57-07

e-mail: redkin@xema-medica.com

internet: www.xema-medica.com

Схема проведения анализа / Test procedure



K119A

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4. СОСТАВ НАБОРА	5
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	6
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	6
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	6
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	7
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	8
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	9
11. ЛИТЕРАТУРА	11

CONTENT

1. INTENDED USE	12
2. SUMMARY AND EXPLANATION	12
3. PRINCIPLE OF THE TEST	13
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	13
5. KIT COMPONENTS	14
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	15
7. TEST PROCEDURE	15
8. QUALITY CONTROL	17
9. CALCULATION OF RESULTS	17
10. EXPECTED VALUES	17
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ IgA АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ *Helicobacter pylori* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» предназначен для качественного выявления концентрации IgA антител к антигенам *Helicobacter pylori* в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. *H.pylori* – широко распространенный микроорганизм, которым инфицирована половина населения земного шара. Его распространенность чрезвычайно высока в развивающихся странах и достаточно низка в развитых странах мира. По данным Всемирной организации гастроэнтерологов, в странах Восточной Европы и Азии инфицированность взрослого населения составляет 70–80 %.

Исследования последних десятилетий показали ведущую роль бактерии *H. pylori* в патогенезе поражений желудка и двенадцатиперстной кишки. *H.pylori* обнаруживают почти у 100 % взрослых пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, примерно у 80 % больных язвенной болезнью желудка, у 92 % больных раком желудка и у 92 % больных с активным хроническим гастритом. Исследованиями доказано, что элиминация хеликобактера приводит к исчезновению гастрита и значительно уменьшает частоту рецидивов язвы двенадцатиперстной кишки.

1.3. Хеликобактериоз – хроническая инфекция с длительным, часто бессимптомным течением. В случае возникновения симптомы не отличаются от клинических проявлений гастродуоденита (обычно – постоянные боли в области эпигастрия). *H.pylori* очень часто присутствует у пациентов, не имеющих клинических проявлений заболевания.

1.4. Штаммы *H.pylori* чрезвычайно гетерогенны и разделяются на две большие группы – штаммы, экспрессирующие антигены VacA и CagA (тип I), и штаммы, которые не экспрессируют эти антигены (тип II). Штаммы первой группы доминируют у пациентов с язвенной болезнью и раком желудка. Белок CagA проникает в клетки эпителия слизистой оболочки, приводит к нарушению митоза и индуцирует хромосомную нестабильность. Если инфекция вызвана штаммами *H. pylori*, экспрессирующими белок CagA, в организме человека вырабатываются антитела специфичные к этому антигену. Антитела к белкам CagA выявляются у 80–100 % пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки и у 94 % больных раком желудка. Поэтому выявление антител, специфичных к белку CagA, является информативным маркером в диагностике язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и рака желудка.

1.5. Штаммы *H.pylori* II типа, которые не экспрессируют антигены CagA и VacA, не ассоциируются с тяжелыми поражениями желудка и двенадцатиперстной кишки, в частности, язвенной болезнью и раком.

1.6. Инфекция *H.pylori* может быть обнаружена как инвазивными, так и неинвазивными диагностическими методами. Инвазивные методы включают исследование биоптатов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта гистологическими, культуральными методами или быстрым уреазным тестом, однако, неоднородное распространение *H.pylori* по слизистой часто приводит к ложноотрицательным результатам. К неинвазивным методам диагностики относятся серологические исследования сыворотки пациента на наличие специфических к *H.pylori* антител и дыхательный уреазный тест с применением радиоактивно меченой мочевины. Иммуоферментный анализ на выявление специфических антител классов IgG/IgA/IgM является минимально инвазивным, быстрым, высокочувствительным и информативным методом диагностики инфекции *H.pylori*.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Выявление IgA антител к антигенам *Helicobacter pylori* основано на использовании непрямого варианта твердофазного иммуоферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован рекомбинантный белок CagA *H.pylori*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата – мышиных моноклональных антител к IgA человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию IgA антител к антигенам *Helicobacter pylori*. Индекс позитивности (ИП, %) IgA антител к антигенам *Helicobacter pylori* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Чувствительность Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» оценивали с помощью панели охарактеризованных сывороток, которая состоит из 42 образцов сывороток крови человека, содержащих антитела к *H.pylori*. В Наборе реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» все сыворотки были определены как положительные. При исследовании 158 отрицательных на антитела к *H.pylori* сывороток показатель специфичности составил более 98%.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов выявления содержания IgA антител к антигенам *Helicobacter pylori* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» не превышает 8.0%.

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на двух сериях Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» (Intra-assay).

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %	CV2, %
1	32	3.7	2.6	2.7
2	32	8.9	4.3	5.1

Коэффициент вариации (CV) для образцов, измеренных на одной серии Набора реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» в течение трех дней (Inter-assay)

образец, №	кол-во повторов	значение, ИП средний	CV1, %
1	8	3.2	3.9
2	8	8.7	6.1

4. СОСТАВ НАБОРА

	Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P119Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт	-
2	CN119AZ CP119AZ	CONTROL - CONTROL+	Контрольные сыворотки (отрицательный и положительный контроль) на основе сыворотки крови человека с известным содержанием IgA антител к антигенам <i>Helicobacter pylori</i> , готовы к использованию (0.5 мл и 0.3 мл соответственно)	2	шт	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
3	T119AZ	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость синего цвета
4	SP119AZ	DIL	ИФА-Буфер , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная жидкость пурпурного цвета
5	R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора (солевой раствор с твин-20 и бензойной кислотой), 26х-кратный (22 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (14 мл)	1	шт	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт	-
9	K119AI	-	Инструкция по применению Набора реагентов « <i>Helicobacter pylori</i> IgA-ИФА»	1	шт	-
10	K119AQ	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов « <i>Helicobacter pylori</i> IgA-ИФА»	1	шт	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 10–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «*Helicobacter pylori* IgA-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 46 исследуемых образцов и 2 проб контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- Буфер для разведения образцов, конъюгат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- контрольные сыворотки после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается. Допускается исследование сывороток, хранение которых с момента забора крови осуществлялось при температуре от +2 °С до +8 °С не более 7 суток.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.7. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 4 лунки для контрольных сывороток (Отрицательный контроль 3 лунки, Положительный контроль 1 лунка).
2	Внесите во все лунки планшета по 90 мкл ИФА-Буфер.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 10 мкл контрольных сывороток. В остальные лунки внесите в дубликатах по 10 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение контрольных сывороток и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут.
4	ВНИМАНИЕ! При внесении образцов сыворотки (плазмы) крови происходит изменение цвета раствора.
5	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п.7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
8	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
9	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
10	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензида. Внесение раствора субстрата тетраметилбензида в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
11	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
12	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

13 Рассчитайте содержание антител к антигенам в исследуемых образцах. Для этого:

1. Рассчитайте среднее значение ОП Отрицательного контроля:

$$\text{ОП (CN119A)Ср} = (\text{ОП1 (CN119A)} + \text{ОП2 (CN119A)} + \text{ОП3 (CN119A)}) / 3;$$

Результаты анализа считать достоверными, если:

- ОП **Положительного контроля** не ниже **0.6 оптических единиц** (ОЕ);
- ОП **Отрицательного контроля** не выше **0.15 ОЕ** во всех лунках.

2. Рассчитайте уровень граничного значения Cut off, для этого к среднему значению ОП Отрицательного контроля прибавьте 0.25

$$\text{Cut off} = \text{ОП (CN119A)Ср} + 0.25$$

3. Рассчитайте Индекс Позитивности (ИП, %) для каждого исследуемого образца, для этого ОП образца разделите на значение Cut off

$$\text{ИП} = \text{ОП образца} / \text{Cut off}$$

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами *GLP* (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Интерпретация результатов:

При $\text{ИП} > 1.1$ образец положительный,
при $\text{ИП} < 0.9$ – отрицательный.

При значении ИП, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-). Такие сыворотки рекомендуется исследовать повторно. Если повторный полученный результат будет неопределенным, то следует провести тестирование сыворотки, полученной через 2–4 недели. В случае получения неопределенных результатов такие образцы считать отрицательными. При интерпретации результатов исследований детских сывороток уровень граничного значения должен быть пониженным на 10%.

Результат исследования детских сывороток		Результат исследования сывороток взрослых	
ИП образца > 0.9	положительный	ИП образца > 1.1	положительный
$0.8 \leq \text{ИП образца} \leq 0.9$	неопределенный	$0.9 \leq \text{ИП образца} \leq 1.1$	неопределенный
ИП образца < 0.8	отрицательный	ИП образца < 0.9	отрицательный

Использование индекса позитивности позволяет проводить полуколичественный сравнительный анализ уровня специфических антител в парных сыворотках крови. ИП в пределах 1.1–7.0 пропорционален содержанию специфических антител класса IgA. Это позволяет проводить исследование парных сывороток полученных от пациентов с интервалом в 2–4 недели.

Если ИП образца составляет выше 7.0 для корректной оценки относительно содержания специфических антител, рекомендуется провести повторный анализ образца предварительно разведенного раствором для разведения сывороток в 10 раз, при определении индекса позитивности в таком случае следует умножить полученное значение ИП на 10.

Такой способ интерпретации результатов анализа позволяет сравнивать уровень специфических антител к *H. pylori* в динамике.

Интерпретация результатов выявления антител классов IgG, IgA и IgM специфичных к белку CagA *H. pylori*

Результат выявления антител к белку CagA <i>H. pylori</i>			Интерпретация результата
IgG*	IgA**	IgM	
Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Образец не содержит специфических антител к CagA <i>H. pylori</i> , либо их концентрация ниже предела чувствительности анализа
Отрицательный	Положительный	Положительный	Вероятная ранняя стадия инфекции, рекомендуется провести повторные исследования через три недели
Отрицательный	Положительный	Отрицательный	
Отрицательный	Отрицательный	Положительный	
Положительный	Отрицательный	Отрицательный	Образец содержит специфические антитела к белку CagA <i>H. pylori</i> , рекомендуется провести комплекс дополнительных обследований: эндоскопия, уреазный тест, бактериология.
Положительный	Положительный	Положительный или Отрицательный	

* – Исследованиями доказано, что снижение титров специфических антител класса IgG является достоверным показателем эффективности терапии и эрадикации *H. pylori*.

** – Специфические антитела класса IgA при инфицировании *H. pylori* значительно чаще обнаруживаются у больных раком и язвой желудка, чем у пациентов с хроническими гастритами.

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Кожанова М.Г. *Helicobacter pylori*: роль в развитии гастродуоденальных заболеваний и методы диагностики // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 11.- С. 52-55.
2. Кучерявый Ю.А. Инфекция *Helicobacter pylori* и заболевания поджелудочной железы // Клиническая фармакология и терапия. – 2004. – Т. 13, № 1. – С. 40-43.
3. Bermejo F, Boixeda D., Gisbert J.P. et al. Concordance between noninvasive tests in detecting *Helicobacter pylori* and potential use of serology for monitoring eradication in gastric ulcer // J Clin Gastroenterol. – 2000. – V.31 N.2 – P.137-41.
4. Holtmann G., Talley N.J., Mitchell H., Hazell S. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health // Am. J. Gastroenterol. – 1998. – Vol.93 N.8 – P.1222-1227.
5. Klaamas K., Held M., Wadström T., Lipping A., Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. // Int. J. Cancer. – 1996 – Vol.67, N.1 – P.1-5.
6. Kosunen T.U., Seppälä K., Saran S. Association of *Helicobacter pylori* IgA antibodies with the risk of peptic ulcer disease and gastric cancer // World J Gastroenterol. – 2005. – V.11, N.43 – P.6871-6874.
7. Kosunen T.U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. // Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. – Lancet. – 1992. – V.339 N.8798 – P.893-895.
8. Me'graud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 20, No. 2. – p. 280-322.
9. Umeda M., Murata-Kamiya N., Saito Y. et al. *Helicobacter pylori* CagA Causes Mitotic Impairment and Induces Chromosomal Instability // J. of Bio. Chem. – 2009 – No. 284 – P.22166-22172
10. WGO Practice Guideline – *Helicobacter pylori* in developing countries. – 2005. – p.54

По вопросам, касающимся качества Набора «***Helicobacter pylori* IgA-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,

тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgA ANTIBODIES TO *HELICOBACTER PYLORI* IN HUMAN SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgA antibodies to *Helicobacter pylori* in serum or plasma.

For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 46 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

H. pylori is detectable in nearly 100% of adult patients with duodenal ulcer, about 80% of patients with gastric ulcer, more than 90% of gastric cancer patients and more than 90% of patients with active chronic gastritis. An association between *H. pylori* and gastric cancer is confirmed. In developing countries, where prevalence of *H. pylori* infection is high (ca. 70-80% of population for Eastern Europe and Asia), most children become infected by the age of 10, and gastric cancer rates are very high. In the USA and other developed countries, standards of hygiene and the increasing socioeconomic status of the population have reduced the incidence of infection, and in parallel, the rates of peptic ulcers and gastric cancer have declined. There is an excellent correlation between the clinical presentation of gastritis, the presence of *H. pylori* in the stomach and elevated serum *H. pylori* IgG antibody. Moreover, eradication of *H. pylori* from a patient leads to a recovery from gastritis and a significant reduction in duodenal ulcer recurrence. *H. pylori*-specific IgG antibody also falls significantly after successful antibacterial therapy.

H. pylori strains are classified into two broad groups - those that express both VacA (vacuolising toxin) and CagA (cytotoxin-associated gene) (type I) and those that produce neither (type II). Type I strains are predominant in patients with ulcers and cancer, while type II strains are mostly associated with asymptomatic infections. 80-100% of patients with duodenal ulcer disease produce CagA antibodies against a 128 kd antigen compared with 60-63% of *H. pylori*-infected persons with gastritis only, indicating that serologic responses to the 128 kd protein are more prevalent among *H. pylori*-infected persons with duodenal ulcers than infected persons without peptic ulceration. In *H. pylori*-infected patients who develop gastric cancer or duodenal ulcer, serum IgG against CagA are found in 94% and 80-100% of patients, resp., thus indicating that detection of antibodies to CagA is a useful marker for diagnosis of gastric cancer and duodenal ulcer. For gastritis, prevalence of IgG-antibodies to *H. pylori* is lower – ca. 60-63%.

The IgM test detects antibodies formed 2-4 weeks after infection with *H. pylori*. IgG and IgA antibodies require up to two months after infection before becoming detectable. If the immune system fails to eradicate the bacterium, it will begin to colonise the mucosal lining of the upper gastrointestinal tract. In the absence of *H. pylori* IgG, IgM positivity should be considered as a reason for treatment only in case of existing active symptoms of gastric ulcer. If treatment is not chosen in the presence of *H. pylori* IgM antibodies, it is advisable to carry out IgG testing after 2-3 months to confirm infection eradication by the immune system.

Interpretation of results of determination of *H. pylori* CagA-specific IgG, IgA and IgM antibodies

Result			Interpretation
IgG*	IgA**	IgM	
Neg	Neg	Neg	No <i>H. pylori</i> CagA-specific antibodies in the specimen, or their concentration is below limit of detection (LOD) of the test
Neg	Pos	Pos	An early stage of infection is suggested; it is recommended to repeat the test in 3 weeks
Neg	Pos	Neg	
Neg	Neg	Pos	
Pos	Neg	Neg	A specimen contains <i>H. pylori</i> CagA-specific antibodies; it is recommended to run additional investigations: endoscopy, urease test, microbiological investigation
Pos	Pos	Pos or Neg	

* - research suggests that drop in CagA-specific IgG titer indicates effectiveness of therapy and eradication of *H. pylori*

** - CagA-specific IgA are much more often found in patients with gastric cancer or ulcer than in patients with chronic gastritis.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on indirect enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated with CagA protein of *Helicobacter pylori*. Antibodies from the specimen bind coated CagA protein of *Helicobacter pylori* on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second peroxidase-labeled antibodies directed towards human IgA, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Positivity index (PI, %) is calculated by the formula (see Calculations). Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5.0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are obtained only when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. Material Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

	Symbol	Description		Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	SORB MTP	<i>Helicobacter pylori</i> IgA EIA strips, 8x12 wells	Polystyrene microwells coated with CagA protein of <i>Helicobacter pylori</i> .	1	pcs		until exp. date
2	CONTROL - CONTROL+	Control sera (0.5 ml and 0.3 ml, resp.)	Dilution of preselected human serum, with high content of IgA antibodies to <i>Helicobacter pylori</i> with preservative - 0.01% Bronidox L, 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless.	2	pcs	yellow; red	2 months
3	CONJ HRP	Conjugate 14 ml	Aqueous solution of murine antibodies to human IgA coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution preservative - 0.01% Bronidox L, 0.01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride and red dye.	1	pcs	blue	until exp. date
4	DIL	EIA Sample buffer 14 ml	Phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0.1% phenol as preservative; contains purple dye.	1	pcs	purple	until exp. date
5	SUBS TMB	Substrate solution,14 ml	Ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp. date
6	BUF WASH 26X	Washing solution concentrate 26X, 22 ml	Aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative.	1	pcs	colourless	concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 45 days at 2-8 °C or 15 days at RT
7	STOP	Stop solution, 14 ml	5.0% vol/vol solution of sulphuric acid.	1	pcs	colourless	until exp. date
8	N003	Plate sealing tape		2	pcs		N/A
9	K119AIE	Instruction <i>Helicobacter pylori</i> IgA EIA		1	pcs		N/A
10	K119AQ	QC data sheet <i>Helicobacter pylori</i> IgA EIA		1	pcs		N/A

5.2 Equipment and material required but not provided:

- distilled or deionized water;
- automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 90-250 µl, is useful but not essential;
- calibrated micropipettes with variable volume, range volume 10-250 µl;
- dry thermostat for 37 °C ±2 °C;
- calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0-3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit.

Store the whole kit at 2 to 8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE.

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at 2...8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation:**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18 to +25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.

- It is recommended to spin down shortly the vials with calibrators on low speed centrifuge.

- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 26X by 26 dilution in distilled water.

7.2. Procedural Note.

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart.

Please, refer to the inside back cover.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 4 wells for control samples CONTROL - CONTROL + (3 and 1 wells resp.) and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 90 µl of EIA Sample buffer into each well.
3	Pipet 10 µl of control samples CONTROL - CONTROL + and unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 26X dilution of washing solution concentrate BUF WASH 26X with distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times.
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
7	Incubate 30 minutes at 37°C.
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells.
10	Incubate 10-20 minutes at 18...25 °C.
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on air.

For the assay to be valid, the following requirements should be met:

1. OD450 for CONTROL+ should be nlt 0.6 AU.
2. OD450 for CONTROL- should not be more than 0.15 AU for all replicates.

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

For the assay to be valid, the following requirements should be met:

1. OD450 for CONTROL+ should be ≥ 0.6 AU.
2. OD450 for CONTROL- should not be more than 0.15 AU for all replicates.

9. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for CONTROL- in triplicates and each pair of samples.
2. Calculate the cut-off value: (mean OD450 for CONTROL-) + 0.25.
3. Calculate Positivity Index (PI) for each sample:

$$PI = \text{mean OD450}(\text{sample}) / \text{Cut-off.}$$

10. EXPECTED VALUES

If PI value is greater than 1.1, the result is POSITIVE.

If PI value is less than 0.9, the result is NEGATIVE.

If PI value is between 0.9 and 1.1, the result is EQUIVOCAL. Such samples should be retested. If the result is equivocal again, a new sample should be obtained 2-4 weeks later and tested again. If the result remains equivocal, the sample should be considered negative. Therapeutic consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutic measures. NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1 Analytical specificity.

Specificity of the test was evaluated on 104 negative serum specimens. Based on these data, specificity of the test is 99%.

11.2 Analytical sensitivity.

Sensitivity of the test was evaluated using internal panel of 15 samples confirmed positive. All samples were found positive - so, sensitivity of the test is 100%.

11.3 Precision.

Intra-assay precision for two different lots (CV1, CV2) is shown below:

Serum, no	Replicates	PI, mean	CV1, %	CV2, %
1	32	2.2	6.3	6.8
2	32	9.2	5.4	5.5

Inter-assay precision is shown below:

Serum, no	No of runs	PI, mean	CV1, %
1	8	2.3	4.5
2	8	8.3	5.5

Символ / Symbol	Значение символа / Symbolize
	Производитель / Manufacturer
	Дата производства / Date of manufacture
REF	Номер по каталогу / Catalogue number
LOT	Номер серии / Batch code
 YYYY-MM	Использовать до (год-месяц) / Use By
	Ограничение температуры / Temperature limitation
IVD	Только для ин витро диагностики / In Vitro Diagnostic Medical Device
	Внимание! / Caution, consult accompanying documents
	Не использовать при нарушении целостности упаковки / Do not use if package damaged
SORB MTP	Планшет / EIA strips
CAL	Калибровочные пробы / Calibrator set
CONTROL	Контрольная сыворотка / Control sera
CONJ HRP	Конъюгат / Conjugate
SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) / Substrate solution
BUF WASH 26X	Концентрат отмывочного раствора / Washing solution concentrate
STOP	Стоп-реагент / Stop solution
DIL	ИФА-Буфер / EIA buffer

Уважаемый Клиент!

Если в процессе работы с нашими Наборами Вам понадобились пластиковые ванночки для жидких реагентов, одноразовые наконечники для дозаторов или дополнительные объемы реагентов (концентрат отмывочного раствора, ИФА-Буфер, раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), стоп-реагент), входящих в состав Набора, просим Вас обратиться к поставщику продукции ООО «ХЕМА» в Вашем регионе.

Все указанные расходные материалы предоставляются бесплатно, в необходимом для проведения анализа количестве.

Перечень наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний производства ООО «ХЕМА»

№ по каталогу	Наименование
K101	«Toxoplasma IgG-ИФА»
K101M	«Toxoplasma IgM-ИФА»
K102	«Rubella IgG-ИФА»
K102M	«Rubella IgM-ИФА»
K103	«Cytomegalovirus IgG-ИФА»
K103M	«Cytomegalovirus IgM-ИФА»
K104	«HSV 1,2 IgG-ИФА»
K104M	«HSV 1,2 IgM-ИФА»
K105	«Chlamydia IgG-ИФА»
K106	«Mycoplasma IgG-ИФА»
K111G	«Сифилис IgG-ИФА»
K111	«Сифилис суммарные антитела-ИФА»
K121	«Aspergillus IgG-ИФА»



Russian Diagnostic
Manufacturers Association



Ассоциация российских
производителей средств лабораторной
диагностики



RUSSIAN ASSOCIATION
OF MEDICAL LABORATORY
DIAGNOSTICS



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ
МЕДИЦИНСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ

Номер горячей линии технической поддержки Клиентов:

8 800 505 23 45

Все звонки на номер горячей линии бесплатны для звонящего с любого мобильного или стационарного телефона по всей территории России.

Ждем Ваших отзывов и предложений по адресам:

Центральный офис ООО «ХЕМА»

Адрес для корреспонденции:

105043, г. Москва, а/я 58

105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж

тел.: +7 (495) 510-57 07, 737-39-36;

факс: +7 (495) 737-00-40

e-mail: info@xema.ru

www.xema-medica.com

ФООО «Хема», тел.: +7 (812) 271-24-41

191144, Санкт-Петербург, Дегтярный пер., д. 8-10, литер А

e-mail: spb@xema.ru

СП ООО «Хемма-Тест», тел.: (17) 211-80-39

Офис: 220029, Минск, Проспект Машерова, д. 11,

литер А, корп. 8/К, офис 416

e-mail: hemma-test@yandex.ru

ТОВ «Хема», тел.: (044) 422-62-16;

03179, г. Киев, ул. Академика Ефремова, д. 23;

e-mail: info@xema.com.ua



xemahelp



xemahelp@gmail.com

