

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА *GIARDIA LAMBLIA* В ОБРАЗЦАХ КАЛА

8304-3, Giardia

Каталог. № : 8304-3

Методика от 03-04-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	Giardia 2nd Generation ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	ИФА типа сэндвич; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль
Образец	1 г образца кала
Специфичность	100 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 100 мин.
Срок годности	12 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для качественного определения антигена *Giardia lamblia* в фекалиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Гардия лямблия является простейшим паразитом, что отвечает за болезнь giardiasis. Симптомы этой болезни включают диарею, рвоты, потерю веса, малабсорбцию, судороги живота, метеоризм и анемию. Болезнь может проявлять себя как острая, хроническая или бессимптомная инфекция. Она является наиболее распространенной болезнью в США, близко 100 миллионов пациентов с нетяжелыми формами регистрируется ежегодно и 1 миллион с тяжелой формой этой болезни.

Основным способом передачи является фекально-оральное попадание кисты. Эпидемии зарегистрированы в центрах дневного ухода и при загрязнении воды. Центры являются прямо и посредственно ответственны за 45% диагнозов инфекции гардии в США. При одном изучении обнаружено 54% инфицированных детей в центре дневного ухода.

Другим важным источником инфекции гардии является гомосексуализм. Этот показатель равен 5-19%.

Диагноз инфекции гардии включает инвазивные и неинвазивные технологии. Одной из неинвазивных технологий является микроскопическое исследование стула, что есть наиболее распространенным. Однако этот метод зависит от технического опыта и последующего наблюдения интактных организмов. Через низкий опыт правильного микроскопического изучения и прерывистого выделения организмов, был исследован альтернативный метод диагностики.

Одной важной альтернативой является энзимно-связанный иммунсорбентный анализ, базирующийся на захвате антигена, в котором используется стул в качестве образца. Этот тест показывает такую же чувствительность, что и при микроскопических изучениях, он более простой в использовании и не требует наблюдения интактных организмов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Во время первой инкубации, антигены гардии, что присутствуют в супернатанте стула, захватываются антителами, привязанными к лункам. Вторая инкубация добавляет дополнительное анти-гардия антитело, что приводит к тому, что антиген оказывается в сэндвиче. Следующая инкубация добавляет анти-второе антитело конъюгированное к пероксидазе. После вымывания для удаления несвязанного энзима, добавляется хромоген, что развивает голубой цвет в присутствующем энзимном комплексе и перекиси. Стоп раствор останавливает реакцию и обращает голубой цвет на желтый.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Материалы, поставляемые с набором

- Стрипы микропланшета:** лунки с антителами к гардии – 96 лунок в держателе.
- Ферментный конъюгат:** 1 бут., содержащая 11 мл поликлональных антител, конъюгированных к пероксидазе хрена, к гардии с тимеросалом.
- Положительный контроль:** 1 флакон, содержащий 2 мл разбавленной гардии положительного формализированного супернатанта стула.
- Отрицательный контроль:** 1 флакон, содержащий 2 мл гардии отрицательного формализированного супернатанта стула.
- Хромоген:** 1 бут., содержащая 11 мл хромогена ТМВ и перекиси.
- Промывочный концентрат (20x):** 2 бут., содержащие 25 мл концентрированного буфера с детергентом и тимеросалом.
- Буфер для разбавления:** 4 бут., содержащие 30 мл буферизованного раствора с детергентом и тимеросалом.
- Стоп раствор:** 1 бут., содержащая 11 мл 5% раствора фосфорной кислоты.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок(с тонким наконечником).
- Вода реагентной марки (DI).
- Градуированный цилиндр.
- Пробирки для разведения образца.
- Аппликаторные палочки (рекомендуются) или тампоны для подготовки образцов.
- Микропипетка.

Рекомендуемое оборудование

Считывающее устройство для биохроматического чтения при длине волны 450/620-650 нм.

Рекомендуемая температура

Все инкубации проводить при комнатной температуре (15-25 °C).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Примечания:

- Убедитесь, что все образцы и реагенты достигли комнатной температуры (15-25 °C) перед использованием. Замороженные образцы должны быть полностью разморожены перед использованием.
- При необходимости подготовленные образцы могут быть центрифугированы при 2000-3000 g в течение 5-10 минут. Убедитесь, что супернатант прозрачный перед использованием.
- Избегайте образования воздушных пузырей во время проведения анализа. Пузырьки могут повлиять на процедуру и считывание результатов теста. Постукивание перевернутыми лунками об чистую впитывающую бумагу после каждого шага промывки должно помочь минимизировать образование воздушных пузырьков в лунках.
- Использовать контроли при каждом проведении анализа. Контроли поставляются предварительно разбавленными. НЕ ТРЕБУЮТ РАЗБАВЛЕНИЯ.
- Анализ проводить согласно процедуре разбавления в лунке или процедуре разбавления в пробирке. Ниже указаны инструкции по проведению процедуры двумя способами.**

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

- Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (15-25 °C) и перемешать.
- (20x) промывочный концентрат может дать осадок при хранении охлажденным, но вернется к нормальному состоянию при комнатной температуре (15-25 °C) и перемешивании.
- Убедитесь, что (20x) промывочный концентрат полностью вернулся в состояние раствора, перед тем, как разводить его до рабочих концентраций.** Для разведения (20x) промывочного концентрата до рабочей концентрации, снять крышку, добавить содержимое 1 бутылки Промывочного Концентрата в гибкую бутылку, содержащую 475 мл DI воды. Перемешать. Гибкая бутылка должна иметь узкий наконечник для оптимизации промывки.

Сбор стула (фекалий)

Никакой особенной техники забора образцов, которая бы отличалась от технологии, что используется при стандартном микроскопическом изучении, не требуется. Образцы стула могут использоваться как не законсервированные или замороженные в транспортировочной среде, так и в среде консерванта 10% формалина. Не законсервированные образцы следует хранить при 2-8 °C и

тестировать в течение 24 часов после забора. Если образец не может использоваться в течение этого времени, он должен быть заморожен до -20°C или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания. Формализованные образцы могут храниться при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$) и исследоваться в течение 18 месяцев после забора. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ такие образцы. Образцы, законсервированные в транспортировочной среде, хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ или при -20°C и тестировать в течение 1 недели после забора.

Все разбавления образцов стула должны проводиться с использованием промывочного буфера. Не использовать буфер для разведения из другой партии.

Тестовая процедура

Процедура разведения в лунке

1. Поместите необходимое количество лунок в держатель (число образцов плюс два контроля).
2. Приготовьте разведения образцов в пробирках, используя **0.3 мл** Буфера для разведений и **0.1 г**, размер маленькой горошины, образца стула, используя аппликаторную палочку. Тщательно перемешать перед использованием.
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТАМПОНОВ, добавить **0.6 мл** буфера для разведений в пробирку для разведения, выжимая как можно больше жидкости. Тщательно перемешать перед использованием.
3. **Для жидких, не законсервированных образцов**, смешать содержимое и добавить **0.1 мл** образца к **0.3 мл** Буфера для разведения в пробирки. Тщательно перемешать перед использованием.
4. **Для образцов в SAF, 10% формалине или Cary-Blair**, тщательно перемешать содержимое в контейнерах. Дальнейшие действия не требуются.
5. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунку 1 и 100 мкл положительного контроля в лунку 2.
6. Используя микропипетку, добавьте 50 мкл буфера разбавителя в каждую лунку образца. НЕ ДОБАВЛЯЙТЕ буфер разбавителя в контрольные лунки.
7. Добавьте 50 мкл образца в каждую лунку с буфером разбавителя.
8. Инкубируйте 60 мин. при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$), потом промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера. Перейти к шагу 9.

Процедура разведения в пробирке

1. Поместите необходимое количество лунок в держатель (число образцов плюс два контроля).
2. Приготовьте разведения образцов в пробирках, используя **0.7 мл** Буфера для разведений и **0.1 г**, размер маленькой горошины, образца стула, используя аппликаторную палочку. Тщательно перемешать перед использованием.
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТАМПОНОВ, добавить **1 мл** буфера для разведений в пробирку для разведения, выжимая как можно больше жидкости. Тщательно перемешать перед использованием.
3. **Для жидких, не законсервированных образцов**, смешать содержимое и добавить **0.1 мл** образца к **0.7 мл** Буфера для разведения в пробирки. Тщательно перемешать перед использованием.
4. **Для образцов в SAF, 10% формалине или Cary-Blair**, перемешать содержимое и добавить **0.2 мл** образца к **0.3 мл** Буфера для разведения в пробирки. Тщательно перемешать перед использованием.
5. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунку 1.
6. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл положительного контроля в лунку 2.
7. Добавьте 100 мкл образца в каждую лунку.
8. Инкубируйте 60 мин. при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$), потом промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера. Перейти к шагу 9.
9. Добавьте **2 капли** ферментного конъюгата в каждую лунку.
10. Инкубируйте **30 мин.** при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$), потом промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера.
11. Добавьте **2 капли** хромогена в каждую лунку.
12. Инкубируйте 10 мин. при комнатной температуре ($15-25^{\circ}\text{C}$).
13. Добавьте **2 капли** стоп раствора в каждую лунку. Смешайте хорошо постукиванием по внешней стенке держателя стрипов указательным пальцем на протяжении 15 секунд. Считайте результаты в течение 5 минут после добавления стоп раствора.

14. Считайте результаты визуально или при $450/620-650$ нм.

***Промывка состоит из энергичного наполнения каждой лунки до краев и декантирования содержимого пять (5) раз. При возможности, избегайте образования воздушных пузырей в лунках, так как это может повлиять на конечные результаты.**

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интерпретация результатов – визуальная

- **Положительный:** Лунка образца, цвет которой наглядно более желтый, чем цвет лунки с отрицательным контролем.
- **Отрицательный:** Лунка образца, цвет которой наглядно менее желтый, чем цвет лунки отрицательного контроля.

Примечание: Отрицательный контроль, как и некоторые образцы, может давать легкий окрас. Лунки с образцами должны быть наглядно темнее, чем лунка отрицательного контроля, что б интерпретировать результат как положительный.

Интерпретация результатов – ИФА-ридер

Обнулите считыватель вхолостую. Считайте все лунки при $450/620-650$ нм.

- **Положительный:** абсорбция считывания 0,08 единиц ОП и выше указывает, что образец содержит антиген гардии.
- **Отрицательный:** абсорбция считывания менее 0,08 единиц ОП и выше указывает, что образец не содержит определяемых уровней антигена гардии.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Анализ проводился при помощи данного анализа с использованием свежих/замороженных образцов, образцов, законсервированных в 10 % Формалине и SAF, и образцов в транспортировочной среде. В общем было использовано 90 образцов, которые были определены как положительные и отрицательные к Гардии микроскопическим методом. Из 90 образцов, 26 дали положительный результат и 64 – отрицательный. Результаты приведены в таблице.

Изучение 1

DAI, <i>Giardia</i>	Микроскопическое исследование	
	+	-
+	26	0
-	0	64

Чувствительность: 100 % (26/26)

Специфичность: 100% (64/64)

Изучение 2

Другой анализ проводился при помощи данного анализа и другого коммерчески доступного анализа с использованием свежих/замороженных образцов, образцов, законсервированных в 10 % Формалине и SAF, и образцов в транспортировочной среде. В общем было использовано 86 образцов, которые были определены как положительные и отрицательные к Гардии микроскопическим методом. Из 86 образцов, 22 дали положительный результат и 64 – отрицательный. Результаты приведены в таблице.

Другой коммерчески доступный анализ ELISA	DAI, <i>Giardia</i>	
	+	-
+	22	0
-	0	64

Положительная согласованность: 100 % (22/22)

Отрицательная согласованность: 100% (64/64)

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

CV в анализе был рассчитан с использованием 4 положительных и 4 отрицательных образцов, анализированных 24 раза в одной процедуре. Средний CV составил 3,67% с самым высоким значением 6,18%.

CV между анализами был рассчитан с использованием 4 положительных и 4 отрицательных образцов, анализированных в трех разных днях. Средний CV составил 4,08% с самым высоким значением 11,61%.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Перекрестная реакция не наблюдалась со следующими организмами:

(См. оригинал инструкции).

Обнаружение и устранение проблем

Проблема: отрицательный контроль показывает существенное развитие цвета.

Причина: неправильная промывка.

Коррекция: Повторите тест с более тщательным промыванием.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Положительный и отрицательный контроли должны проводиться при каждом тестировании. Использование положительного и отрицательного контроля дает возможность простой оценки пригодности набора.

1. Для этого положительный контроль должен давать абсорбцию, по крайней мере, 0.5 единиц ОП.
2. Абсорбция отрицательного контроля должна быть меньше, чем 0,08 единиц ОП. Если значения вне этих пределов, набор не следует использовать.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Результаты исследования должны использоваться в целях диагноза и не должны интерпретироваться как диагностика сама по себе.
2. НЕ КОНЦЕНТРИРУЙТЕ образцы стула. Анализ при этом может не показать точных результатов.
3. Отрицательный результат может быть при уровне антигена ниже, чем определяемые границы этого анализа.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы нормальных здоровых особ не должны содержать гардии и должны исследоваться как отрицательные. Положительная реакция указывает, что у пациента был выброс определяемого количества антигена гардии. Некоторые группы людей, такие как гомосексуалисты и дети стационара, показали более высокую степень инфицирования гардией, чем обычная группа людей.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ/ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Не отклоняться от установленных процедур проведения анализа. Все разбавления образца, время/температура инкубации и промывки были оптимизированы для получения наилучших результатов. Отклонения от установленных процедур могут повлиять на чувствительность и специфичность теста.
2. Только для диагностики *in vitro*.
3. Не менять реагенты из разных наборов.
4. Не использовать реагенты после окончания срока годности.
5. Не используйте растворы, если они содержат осад или становятся мутными. (Исключение: в моющем концентрате может быть осад при хранении в холодильнике, но он растворяется при нагревании.)
6. Не добавляйте азиды в реагенты или образцы.
7. Контроли и некоторые реагенты содержат тимерозал в качестве консерванта.
8. Обращайтесь со всеми реагентами и образцами как с потенциально инфицированными.
9. Стоп раствор является 5% раствором фосфорной кислоты в воде. При попадании на кожу промойте большим количеством воды. При попадании в глаза промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу.
10. Использование SAF обработанных образцов не подходит в этом анализе ELISA.
11. Персоны, что не могут считать окрас или визуально сравнить, должны считать тест визуально и должны использовать спектрофотометр для интерпретации результатов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, стрипы и содержимое бутылок: храните при 2-8°C. Разбавленный Промывочный буфер может храниться при комнатной температуре в гибкой бутылке.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Черновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com