



Набор ИФА для качественного определения антигена *Cryptosporidium* в стуле

Каталог. № :8301-3
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 20-11-2010

Внимание: основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

Анализ	Cryptosporidium ELISA
Метод	Ферментно-связанный иммуносорбентный
Принцип	"Сэндвич", планшет, покрытый антителами
Диапазон обнаружения	Качественный положительный; отрицательный контроль
Образец	1 гм образца кала
Специфичность	98%
Чувствительность	93%
Общее время	~ 100 мин.
Срок годности	12 мес.

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор ELISA – иммунологический анализ *in vitro* для качественного определения антигена *Cryptosporidium* в образцах стула. Основанный на принципе двойного антитела («сэндвича») метод иммуноферментного анализа (ELISA) использует антитело анти-*Cryptosporidium*, чтобы захватить антиген от супернатанта стула. Затем добавляется второе антитело анти-*Cryptosporidium*, которое наслаивается на захваченный антиген. Эта реакция визуализируется добавлением анти-второго антитела, конъюгированного с пероксидазой и хромогена тетраметилбензидина (ТМВ). Образовавшийся синий цвет указывает на присутствие антигенов *Cryptosporidium*, связанных антителами анти-*Cryptosporidium*.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

В течение первой инкубации, *антигены Cryptosporidium*, присутствующие в супернатанте стула, захватываются антителами, закрепленными на лунках. Вторая инкубация прибавляет дополнительное антитело анти-*Cryptosporidium*, которое «наслаивается» на антиген. Следующая инкубация добавляет анти-второе антитело, конъюгированное с пероксидазой. После промывок для удаления несвязанного фермента добавляется хромоген, который развивает синий цвет в присутствии комплекса фермента и перекиси. Стоп раствор останавливает реакцию и превращает синий цвет в желтый.

Позиция	РЕАГЕНТЫ	Описание
Полоски для анализа	Микролунки, покрытые поликлональными антителами анти- <i>Cryptosporidium</i> - 96 лунок в рамке для полосок.	
Ферментный конъюгат	1 бутылка с 11 мл козлиных антител анти- <i>Cryptosporidium</i> с синим красителем и тимеросалом.	
Положительный контроль	1 флакон с 2 мл разбавленного <i>Cryptosporidium</i> положительного формализованного супернатанта стула.	
Отрицательный контроль	1 флакон с 2 мл <i>Cryptosporidium</i> отрицательного формализованного супернатанта стула.	
Хромоген	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМВ) и перекиси.	
Промывочный концентрат (20х)	2 бутылки с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества с тимеросалом.	
Буфер для разбавления	4 бутылки с 30 мл забуференного белкового раствора, содержащего тимеросал	
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 5% фосфорной кислоты.	

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не используйте растворы, если они выпадают в осадок или становятся мутными.

Исключение: Промывочный концентрат может выпадать в осадок во время хранения в холодильнике, но растворяется после нагревания.

Не добавлять в образцы или в любые реагенты азиды.

Контроли и некоторые реагенты содержат тимеросал в качестве консерванта.

Обращайтесь со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами. Предотвращайте образование, аэрозолей и обеззараживайте любые брызги образцов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках:

Хранить при 2-8°C.

Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА

Промывочный буфер - снимите колпачок и добавьте содержимое 1 бутылки промывочного концентрата в гибкую бутылку с 475 мл дистиллированной воды. Завихрируйте, чтобы перемешать. Для оптимизации промывок гибкая бутылка должна иметь узкий наконечник.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

Сбор стула (кала)

Не требуется никакого изменения методов сбора, используемых для стандартных микроскопических ОР испытаний. Могут использоваться свежие и замороженные образцы стула или хранящиеся в среде консерванта как 10% формалин, SAF (натрия ацетат-уксусный кислотный формалин) или MF (меланин-формальдегид).

Образцы, не обработанные консервантом, должны храниться при 2 - 8°C и анализироваться в пределах 24 часов с момента сбора. Образцы, которые не анализируются в пределах этого времени должны заморозиться до использования при -20°C или ниже. Замораживание образцов не воздействует неблагоприятно на анализ.

Формализованные, обработанные SAF и MF образцы, могут храниться при комнатной температуре (15-25°C) и анализироваться в пределах 18 месяцев с момента сбора. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ обработанные консервантом образцы.

Все разбавления необработанных консервантом образцов стула должны быть проведены с промывочным буфером

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Свежие / замороженные образцы стула

При необходимости разморозьте образец. Добавьте достаточно разбавленного промывочного буфера, чтобы провести разбавление приблизительно 1:4 (1 грамм или размером с горошину образца стула с 3 мл разбавленного промывочного буфера) и хорошо перемешайте.

Обработанные консервантом образцы стула (формалином, SAF и MF).

Тщательно перемешайте содержимое емкости для сбора. Дальнейшая обработка не требуется.

ПРОЦЕДУРА

Поставляемые материалы

Микронулочный ELISA набор для определения антигена *Cryptosporidium* в стуле.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок.
- Дистиллированная вода.
- Мерная колба.

Рекомендуемое оборудование

ELISA спектрофотометр для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм.

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Приведите все образцы и реагенты к комнатной температуре (15-25°C). Замороженные образцы необходимо полностью разморозить перед исследованием.
- При необходимости приготовленные образцы можно отцентрифугировать при 2000-3000 г на протяжении 5-10 мин. Уверьтесь в том, что супернатант чист.
- При проведении анализа старайтесь избегать образования пузырей в лунках. Пузыри могут повлиять на анализ и результаты. Вытряхивайте лунки на чистое абсорбирующее полотенце после каждого этапа промывки,

это поможет минимизировать возможность образования пузырей.

- При каждом анализе нужно использовать контроли. Контроли поставляются предварительно разбавленными. БОЛЬШЕ НЕ РАЗВОДИТЬ.
- Образцы можно анализировать, следуя процедуре разбавления в лунке, или процедуре разбавления в пробирке. Ниже читайте инструкции по проведению каждой процедуры.

Процедура разбавления в лунке:

1. Отломить требуемое количество лунок (две для контролей и определенного количества образцов) и положить в рамку для полосок.
2. приготовьте разбавление образцов в пробирке, используя 0,3 мл буфера для разбавления и 0,1 г (размером с маленькую горошину) образца кала с помощью палочки-аппликатора. Хорошо смешайте.
- при использовании помазка: добавьте 0,6 мл буфера для разбавления в пробирку. Покройте помазок тонким слоем образца и перемешайте его с буфером, получив как можно больше жидкости. Хорошо смешайте перед использованием.
3. Для водянистых безконсервантных образцов: смешайте содержимое в пробирке и добавьте 0,1 мл образца и 0,3 мл буфера для разбавления. Хорошо перемешайте.
4. Для образцов в SAF, 10% формалине или Cary-Blair, тщательно смешайте содержимое в контейнере. Больше ничего не требуется.
5. С помощью микропипетки добавить 100 мкл отрицательного контроля в лунку #1, 100 мкл положительного контроля в лунку #2
6. С помощью микропипетки добавить 50 мкл буфера для разбавления в каждую лунку образца. НЕ ДОБАВЛЯЙТЕ буфер для разбавления в контрольные лунки.
7. Добавить 50 мкл образца в каждую с образцом с буфером для разбавления.
8. Инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течении 60 минут, затем промыть*. После последней промывки, встряхните лунки, постучав ими о промокательную бумагу, чтоб удалить остатки промывочного буфера. Перейдите к этапу 9.

Процедура разбавления в пробирке:

1. Отломить требуемое количество лунок (две для контролей и определенного количества образцов) и положить в рамку для полосок.
2. Приготовьте разбавление образцов в пробирке, используя 0,7 мл буфера для разбавления и 0,1 г (размером с маленькую горошину) образца кала с помощью палочки-аппликатора. Хорошо смешайте.
- при использовании помазка: добавьте 1 мл буфера для разбавления в пробирку. Покройте помазок тонким слоем образца и перемешайте его с буфером, получив как можно больше жидкости. Хорошо смешайте перед использованием.
3. Для водянистых безконсервантных образцов: смешайте содержимое в пробирке и добавьте 0,1 мл образца и 0,7 мл буфера для разбавления. Хорошо перемешайте.
4. Для образцов в SAF, 10% формалине или Cary-Blair, тщательно смешайте содержимое и добавьте 0,2 мл образца и 0,3 мл буфера для разбавления. Хорошо перемешайте.
5. С помощью микропипетки добавить 100 мкл отрицательного контроля в лунку #1.
6. С помощью микропипетки добавить 100 мкл положительного контроля в лунку #2
7. Добавить 100 мкл разбавленного образца в каждую лунку.
8. Инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течении 60 минут, затем промыть*. После последней промывки, встряхните лунки, постучав ими о промокательную бумагу, чтоб удалить остатки промывочного буфера. Перейдите к этапу 9.
9. Добавить в каждую лунку по 2 капли ферментного конъюгата.
10. Инкубировать при комнатной температуре в течении 30 минут, затем промыть. После последней промывки, встряхните лунки, постучав ими о промокательную бумагу, чтоб удалить остатки промывочного буфера.
11. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена.
12. Инкубировать при комнатной температуре (15-25°C) в течении 10 минут.
13. Добавить в каждую лунку по 2 капли стоп раствора. Перемешайте содержимое лунок, осторожно постукивая по рамке для полосок указательным пальцем на протяжении

прибл. 15 секунд. Считайте реакцию на протяжении 5 минут после добавления стоп-раствора.

14. Считать результаты визуально или на ИФА-планшетном считывателе (см. инструкции внизу).

* Промывки состоят из заполнения до края каждой лунки и опорожнения 5 раз. По возможности избегайте образования пузырей, так как это может повлиять на результаты.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - визуальная:

Реактивный: Любая лунка с образцом, которая явно более желтая, чем лунка отрицательного контроля.

Нереактивный: Любая лунка с образцом, которая явно менее желтая, чем лунка отрицательного контроля.

ЗАМЕЧАНИЕ: Отрицательный контроль, также как и некоторые образцы, может показывать некоторый слабый цвет. Чтобы результат назвать положительным лунка образца должна быть явно темнее, чем лунка отрицательного контроля.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – ELISA считыватель:

В рабочем режиме установите на ноль планшетный считыватель ELISA. Считайте все лунки при 450/620-650 нм.

Реактивный: мера поглощения света считывания 0.15 единиц и выше указывает на содержание в образце антигена *Cryptosporidium*.

Нереактивный: мера поглощения света считывания меньше чем 0.15 единиц указывает, что образец не содержит обнаруживаемых уровней антигена *Cryptosporidium*.

ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты анализа должны использоваться как вспомогательное средство в диагностике и не должны интерпретироваться как сам диагноз.

НЕ концентрируйте образцы стула. Анализ не даст точных результатов при концентрированном образце. Отрицательный результат может быть получен при уровне антигенов ниже за пределы обнаружения этого анализа. Многократные выборки через какое-то время могут быть существенными для тех пациентов, которые подозреваются как положительные к *Cryptosporidium*.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Обычные здоровые люди не должны иметь *Cryptosporidium* и должны показывать отрицательные результаты. Положительная реакция указывает, что пациент сбрасывает обнаруживаемые количества антигена *Cryptosporidium*.

Некоторые совокупности людей, такие как гомосексуалисты и дети в местах дневного ухода за ними, продемонстрировали повышенные показатели заражения *Cryptosporidium*, чем обычные совокупности людей.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Изучение #1 – против микроскопии

K-во = 71

		Микроскопия	
		+	-
DAI	+	25	1
	-	2	43

Чувствительность: 25/27 = 93%

Специфичность: 49/44 = 98%

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Данным анализом можно определить приближ. 30 нанogramм/мл антигена *Cryptosporidium*.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование положительного и отрицательного контролей позволяет легко проверять стабильность набора. Для действительного анализа положительный контроль должен составлять по крайней мере 0.5 единиц ОП, и отрицательный контроль должен быть ниже 0.15 единиц ОП. Если значения вне этих диапазонов, набор не должен использоваться.

ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема: Отрицательный контроль значительно развил цвет.

Исправление: Несоответствующие промывки. Повторить анализ с более тщательными промывками.

Литература:

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua

