



## ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *ENTAMOEBА HISTOLYTICA* В ОБРАЗЦАХ КАЛА

**Кат. №** : E-018  
**Количество тестов:** 96  
**Производитель** : Seramun Diagnostica GmbH, (Германия)

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 23-11-2011

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

*Entamoeba Histolytica* является возбудителем амебиаза (амебной дизентерии, амебного абсцесса печени). Только трофозоиты вирулентных штаммов вторгаются в стенку кишечника и вызывают язвы, выпуская кровь и слизистую в фекалии. Инвазивные амебы попадают в печень через энтеральную сосудистую систему и приводят к серьезным абсцессам (1). Инфекционные кисты распространяются фекально-оральной передачей. Вегетативные трофозоиты выпускаются экцистированием и размножаются делением пополам.

Между тем, молекулярно-биологические (ПЦР) и биохимические (изоферментный анализ) методы подтверждают классификацию патогенных, инвазивных штаммов как отдельный вид *Entamoeba Histolytica*. Неинвазивные штаммы классифицируются как *Entamoeba dispar*. Два вида имеют одинаковые морфологии и поэтому микроскопическая дифференциация невозможна (1-6).

*Entamoeba Histolytica* выпускает специфические антигены в кишечник в течение своего жизненного цикла. Эти антигены выделяются с калом инфицированных лиц. Выявление антигена с помощью иммуноферментного анализа может служить конкретным и легко выполнимым методом, альтернативным микроскопии.

### НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор **Serazym® *Entamoeba Histolytica*** предназначен для использования в in-Vitro диагностике для прямого определения специфического антигена *Entamoeba Histolytica* в образцах кала.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

**Serazym® *Entamoeba Histolytica*** это быстрый иммуноферментный двухшаговый анализ по качественному определению *Entamoeba Histolytica*, основанный на поликлональных пептидных антителах, который распознает два различных эпитопа мембранного протеина, богатого на серин 30 кД (SREHP), *Entamoeba Histolytica*.

Разведенные образцы стула, а также положительные и отрицательные контроли реагируют на первой стадии инкубации, которая длится 60 минут при комнатной температуре, со связанными антителами твердой фазы. В последующей стадии промывки несвязанные компоненты удаляют из лунок.

На следующем шаге HRP-меченные антитела реагируют с твердой фазой связанных комплексов антитело-антиген в течение 30 минут при комнатной температуре. Несвязанный материал отделяется от твердофазных иммунных комплексов на последующей стадии промывки.

HRP преобразует последовательно добавленный бесцветный раствор субстрата 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМВ) в синий продукт. Ферментная реакция останавливается добавлением серной кислоты в лунки после 10 мин инкубации при комнатной температуре, окрашивая раствор из синего в желтый.

Оптическая плотность (ОП) раствора, считываемая при 450/620 нм, прямо пропорциональна специфически связанному количеству антигена *Entamoeba Histolytica*.

### ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

#### Сбор и хранение

Образцы кала должны храниться при 2-8 °С сразу же после сбора и обрабатываться в течение 72 часов. Более длительное хранение возможно при -20 °С. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Образцы кала, разбавленные растворителем для образцов, могут храниться на протяжении 72 часов при 2-8 °С до тестирования.

Образцы кала, разбавленные в транспортировочной среде, не должны использоваться.

### Подготовка

Нагрейте образцы до комнатной температуры и тщательно перемешайте.

Внесите **1000 мкл** буфера для разведения образцов в чистую пробирку. Используя одноразовую стеклянную палочку, перенесите примерно **200 мг** (диаметр примерно 4-6 мм) образца кала (если он твердый) или пипетируйте **200 мкл** (если жидкий) в пробирку и тщательно ресуспендируйте. Если необходимо, осадите плавающие частицы центрифугированием в микроцентрифуге на максимальной скорости в течение 1 минуты.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Компонент набора (96 лунок)	Количество
<b>1. Микропланшет «WELLS»</b> 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипа (всего 96 лунок), покрытых кроличьими поликлональными антителами анти-SREHP	1 планшет в вакуумной упаковке с осушителем
<b>2. Буфер для промывок, «WASHBUF 10X»</b> концентрат 10x, для приготовления 1000 мл раствора	100 мл Концентрат Белая крышка
<b>3. Буфер для разведения образцов, «DIL»</b>	100 мл Готов к использованию Красного цвета Черная крышка
<b>4. Положительный контроль</b> SREHP пептид	2.0 мл Готов к использованию Синего цвета Красная крышка
<b>5. Отрицательный контроль</b> Образец негативный по <i>Entamoeba Histolytica</i>	2.0 мл Готов к использованию Синего цвета Зеленая крышка
<b>6. Конъюгат HRP «CONJ HRP»</b> Поликлональные антитела анти- SREHP (овца), меченные HRP	12 мл Готов к использованию Зеленого цвета Коричневая крышка
<b>7. Раствор субстрата «SUBSTR TMB»</b> 3,3', 5,5'-тетраметилбензидин и перекись водорода	15 мл Готов к использованию Синяя крышка
<b>8. Стоп-раствор «STOP»</b> 0.25 M фосфорная кислота	15 мл Готов к использованию Желтая крышка

### ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

- ✓ микропипетки
- ✓ многоканальные пипетки
- ✓ контейнер для реагентов для многоканальных пипеток
- ✓ 8-канальная гребенка с вакуумным насосом и бутыл для отходов или микропланшетный вошер
- ✓ микропланшетный ридер для измерения оптической плотности при длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм или 690 нм
- ✓ дистиллированная или деионизированная вода
- ✓ стеклянная лабораторная посуда
- ✓ пробирки (2 мл) для приготовления образцов

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

#### Количество тестов и срок годности

Один набор предназначен для проведения 96 определений. Срок годности каждого компонента указан на этикетке соответствующего флакона, а всего набора - на внешней этикетке упаковки набора.

После получения все компоненты набора должны храниться при 2-8 °С, желательнее в оригинальной упаковке набора.

После вскрытия все компоненты набора стабильны не менее 2 месяцев, при условии правильного хранения.

Готовый к использованию раствор промывочного буфера стабилен минимум 1 месяц при 2-8 °С.

#### Подготовка реагентов

Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры.

Микропланшет хранится в запечатанном пакете из фольги, с осушителем. Планшет состоит из рамки и «ломаемых» стрипов. Пакет с планшетом должен достичь комнатной температуры перед вскрытием. Неиспользованные лунки должны храниться в холодном месте и защищены от влаги, в оригинальной тщательно запечатанной упаковке.

Приготовьте достаточное количество буфера для промывки:

разведите концентрат буфера для промывки в 10 раз (1 + 9) дистиллированной или деионизированной водой.

Например: 10 мл концентрата буфера для промывки + 90 мл дистиллированной воды.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1:6, например, 200 мг или 200 мкл образца кала + 1.0 мл буфера для разведения образцов (3)
- Избегайте даже незначительного сдвига времени при внесении реагентов и образцов.
- Убедитесь в том, что промывочный буфер находится в лунках не менее 5 секунд за один цикл, и что оставшаяся жидкость полностью удалена при каждом цикле промывки.
- Избегайте попадания света на раствор субстрата ТМБ!

#### Выполнение процедуры

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достигь комнатной температуры (22-25 °С). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
2. Внесите по:  
3 капли (или 100 мкл) положительного контроля «CONTROL +» (4)  
3 капли (или 100 мкл) отрицательного контроля «CONTROL -» (5)  
100 мкл разведенных образцов кала
3. Закройте планшет и инкубируйте 60 мин при 22-25 °С.
4. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку 5 раз, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
5. Внесите 3 капли (или 100 мкл) «CONJ HRP» (6) в каждую лунку
6. Закройте планшет и инкубируйте 30 мин при 22- 25 °С.
7. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку 5 раз, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
8. Внесите 3 капли (или 100 мкл) «SUBSTR TMB» (7) в каждую лунку
9. Закройте планшет и инкубируйте 10 мин при 22-25 °С защищая от света.
10. Внесите 3 капли (или 100 мкл) «STOP» (8) в каждую лунку, аккуратно перемешайте.
11. Считайте ОП при длине волны 450 нм (длина волны сравнения ≥620 или 690 нм) с помощью микропланшетного ридера в течение 30 минут после остановки реакции.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### Качественная оценка

##### Определение уровня «cut-off»:

##### ОП отрицательного контроля + 0.20

Образцы, для которых ОП равна или выше значения «cut-off» должны быть признаны положительными, а образцы, для которых ОП ниже значения «cut-off» должны быть признаны отрицательными на содержание *Entamoeba Histolytica*.

#### РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

##### Serazym® *Entamoeba Histolytica*

Отрицательные	< Cut-off
Положительные	≥ Cut-off

Каждой лаборатории рекомендуется установить свои собственные референсные диапазоны нормальных и патологических значений, как это обычно делается для других диагностических параметров. Указанные выше референсные значения приводятся только как ориентировочные, которые можно ожидать.

#### Валидность теста

Данный тест считается действительным только в случае, если:

- Средняя ОП отрицательного контроля  
≤ 0.20 (ручная процедура)  
≤ 0.30 (автоматическая процедура)

- Средняя ОП положительного контроля  
≥ 0.80

Если эти критерии не выполнены, результаты должны быть признаны недействительными, и тестирование должно быть повторено. Убедитесь, что процедура анализа выполняется корректно (соответствующие периоды инкубации и температуры, разведения образцов и буфера для промывок, этапы промывок и

т.д.). В случае повторного невыполнения критериев достоверности обращайтесь к своему поставщику.

#### Ограничения метода

Нет корреляции между измеряемой ОП и тяжестью инфекции. Не допустимо проводить сравнение ОП, получаемых для образцов и для положительного контроля.

Перекрестная контаминация образцов и реагентов может приводить к ложноположительным результатам. Некорректные разведения, недостаточно гомогенизированные образцы или твердые частицы в образцах, оставшиеся после центрифугирования, могут давать ложноотрицательные результаты. Ферментированные образцы со значением pH ниже 5 после ресуспендирования могут давать ложноотрицательные результаты. Образцы, обработанные формалином, могут давать ложноположительные результаты.

Отрицательные результаты данного анализа не исключают инфекции *Entamoeba Histolytica*.

При интерпретации любых результатов исследований методом ИФА (ELISA) необходимо учитывать результаты микробиологических исследований и полную клиническую картину.

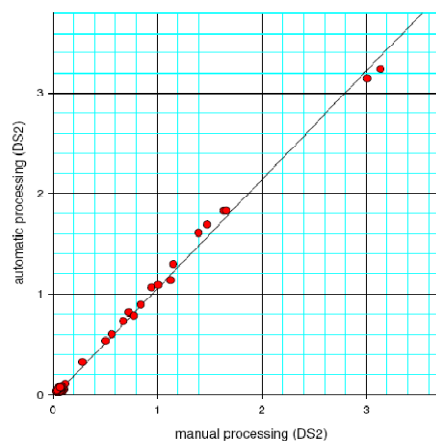
#### Автоматическая процедура

Постановка данного набора на полностью автоматизированных анализаторах может привести к завышенным результатам абсорбции по сравнению с ручными методиками из-за различий в процедурах промывки и техническим характеристикам оборудования. В этих случаях для негативного контроля допускается значение абсорбции 0.3. Рекомендуется использовать процедуру промывки 10 секунд с замачиванием на стрип, с промывками одна за другой и 10 с замачиванием после последней промывки в цикле. При необходимости число промывок можно увеличить с 5 до 7-8.

#### Корреляция:

##### Ручная - автоматическая процедура

##### Serazym® *Entamoeba Histolytica* Корреляция плотностей (n=140) r=0.998



#### ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

##### Воспроизводимость

Коэффициент вариации внутри серии (CV) при тестировании данным методом Serazym® *Entamoeba Histolytica* рассчитан из анализа 12 повторов образцов:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.841	0.137	7.5
2	1.208	0.078	6.5
3	0.620	0.040	6.4
4	0.463	0.024	5.3

Коэффициент вариации между сериями (CV) при тестировании данным методом Serazym® *Entamoeba Histolytica* рассчитан из анализа в 11 различных постановках по 3 повтора каждого образца:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	2.720	0.128	4.7
2	1.647	0.122	7.4
3	0.968	0.074	7.7
4	0.409	0.019	4.6

**Нижний предел обнаружения**

Нижний предел обнаружения определяется путем титрования проб фекалий, в которые были введены трофозоиты культуры. Нижний предел обнаружения составил:

$5 \times 10^3$  –  $6 \times 10^3$  трофозоиты на мл суспензии кала.

**Специфичность**

Было протестировано 160 образцов кала параллельно данным методом *Serazym® Entamoeba Histolytica*.

Все образцы дали отрицательный результат (OD < cut-off), соответствующий специфичности в 100 %.

**Перекрестная реактивность**

Образцы фекалий, положительные к одному из следующих кишечных паразитов, и, соответственно, другим патогенным микроорганизмам, не показали каких-либо перекрестных реакций в *Serazym® Entamoeba Histolytica*:

*Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia lamblia*.

Негативные образцы кала насыщались  $\geq 10^8$  КОЕ микроорганизмами (см. табл. ниже) и протестированы с отрицательным результатом данным набором (<Cut-off).

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7956)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica Serovar enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica Serovar typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Yersinia enterocolitica (O3, O9)</i>	clinical isolates

**СХЕМА ИНКУБАЦИИ** – (См. Оригинал инструкции)

**РЕКОМЕНДАЦИИ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**Данный набор предназначен только для использования *in vitro*.** Точно соблюдайте инструкции. Тестирование данным методом должно проводиться только квалифицированным персоналом.

Соблюдайте сроки годности, указанные на этикетках реагентов. Обращайте внимание и соблюдайте сроки стабильности разведенных реагентов.

**Не используйте и не смешивайте реагенты различных лотов, за исключением буфера для образцов, буфера для промывок, раствора субстрата ТМВ и стоп-раствора.**

Не используйте реагенты других производителей.

Не допускайте сдвига времени во время пипетирования реагентов.

Все реагенты должны храниться при 2... 8 °С перед использованием.

Некоторые реагенты содержат незначительные количества тимерозала (< 0.1 % w/v) и катона (1.0 % v/v) в качестве консервантов. Не допускайте их проглатывания или контакта с кожей или слизистыми оболочками.

Обращайтесь со всеми компонентами и образцами как с потенциально опасными.

Так как набор содержит потенциально опасные материалы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- Не курите, не ешьте или не пейте при работе с материалами набора,
- Всегда используйте защитные перчатки,
- Никогда не пипетируйте материалы ртом,
- Обращайте внимание на меры предосторожности при работе с каждым отдельным компонентом набора.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «**ДИАМЕБ**»

ООО «**БиоТехЛаб-С**»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: [www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

[www.biotechlab.com.ua](http://www.biotechlab.com.ua)