



**ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ УСТРОЙСТВО
ДЛЯ ПРЯМОГО ОБНАРУЖЕНИЯ
GIARDIA LAMBLIA
В ОБРАЗЦАХ КАЛА**

Кат. № : E-038
Количество тестов: 96
Производитель : Seramun Diagnostica GmbH, (Германия)

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

Методика от 25-03-2011

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Giardia lamblia является одним из наиболее распространенных паразитических заболеваний кишечника во всем мире. Заболеваемость сильно зависит от географического региона и достигает 2-7% в Центральной Европе и более 50% в тропических странах (1,2).

Жизненный цикл *Giardia* лямблий характеризуется двумя этапами: Трофозоит и кистозная стадия. Трофозоит является стадией подвижного деления и происходит в верхней части тонкой кишки. Возрастание инфекции желчного пузыря может также произойти. Киста является инфекционной формой паразита. Она развивается в кишечнике и выделяется с фекалиями. Кисты передаются через загрязненную пищу или воду питьевую, а также и от человека к человеку (3). Клиническая картина инфекции *Giardia* лямблий варьирует от бессимптомного носительства до острой диареи, которая часто сопровождается болями в животе и метеоризмом. Хронический лямблиоз может привести к тяжелому синдрому малабсорбции (1,2).

Лямблиоз обычно диагностируется микроскопическим обнаружением трофозоитов и/или кист в фекальных мазках после общепринятых методов окрашивания или прямой иммунной флюоресценции. Эти методы являются трудоемкими, требующие квалифицированного персонала и могут только выявлять паразитов с неповрежденной морфологии. Иммунологические методы, такие как иммуноферментный, обнаруживающие антигены лямблий *Giardia*, могут преодолеть эти проблемы (4).

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор *Serazym® Giardia lamblia* предназначен для использования в in-Vitro диагностике для прямого определения *Giardia* лямблий в образцах кала.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Serazym® Giardia lamblia это быстрый иммуноферментный двухшаговый анализ по качественному определению *Giardia lamblia*, основанный на поликлональных антителах (кролик), меченых конъюгатом пониженной растворимости и пероксидазы хрена (HRP). Разведенные образцы стула, а также положительные и отрицательные контроли реагируют на первой стадии инкубации, которая длится 30 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 (TMB) 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 *Giardia lamblia*. Учитывая предельные значения, результаты интерпретируются как положительные или отрицательные.

ПОДГОТОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сбор и хранение

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

Подготовка

Быстро позволяйте оттаять замороженным образцам; нагрейте образцы до комнатной температуры и тщательно перемешайте.

Внесите 1000 мкл буфера для разведения образцов в чистую пробирку.

Используя одноразовую стеклянную палочку, перенесите примерно 100 мг (диаметр примерно 2-3 мм) образца кала (если он твердый) или пипетируйте 100 мкл (если жидкий) в пробирку и тщательно ресуспендируйте. **Если необходимо, осадите плавающие частицы центрифугированием в микроцентрифуге на максимальной скорости в течение 10 минут, не больше.**

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Компонент набора (96 лунок)	Количество
1. Микропланшет «WELLS» 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипа (всего 96 лунок), покрытых кроличьими поликлональными антителами к <i>Giardia lamblia</i>	1 планшет в вакуумной упаковке с осушителем
2. Буфер для промывок, «WASHBUF 10X» концентрат 10x, для приготовления 1000 мл раствора	100 мл Концентрат Белая крышка
3. Буфер для разведения образцов, «DIL»	100 мл Готов к использованию Черная крышка
4. Положительный контроль Инактивированные цисты <i>Giardia lamblia</i>	2.0 мл Готов к использованию Красная крышка
5. Отрицательный контроль Образец негативный по <i>Giardia lamblia</i>	2.0 мл Готов к использованию Зеленая крышка
6. Конъюгат HRP «CONJ HRP» Поликлональные антитела анти- <i>Giardia lamblia</i> (кролик), меченные HRP	12 мл Готов к использованию Коричневая крышка
7. Раствор субстрата «SUBSTR TMB» 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и перекись водорода	15 мл Готов к использованию Синяя крышка
8. Стоп-раствор «STOP» 0.25 М 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 бутылка 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 °C, желательно в оригинальной упаковке набора. После вскрытия все компоненты набора стабильны не менее 2 месяцев, при условии правильного хранения.

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.

Этот готовый к использованию промывочный раствор стабилен как минимум 30 дней при хранении при 2-8 °С.

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!

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1+10, например, 100 мг или 100 мкл образца кала + 1.0 мл буфера для разведения образцов (3)
- Избегайте даже незначительного сдвига времени при внесении реагентов и образцов.

Выполнение процедуры

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °С). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
2. Внесите по:
2 капли (или 75 мкл) положительного контроля «CONTROL +» (4)
2 капли (или 75 мкл) отрицательного контроля «CONTROL -» (5)
100 мкл разведенных образцов кала
3. Закройте планшет и инкубируйте 30 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 2 капли (или 75 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 2 капли (или 75 мкл) «SUBSTR TMB» (7) в каждую лунку
9. Закройте планшет и инкубируйте 10 мин при 22-25 °С защищая от света.
10. Внесите 2 капли (или 75 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 *Giardia lamblia*.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Serazym® *Giardia lamblia*

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
- 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 рН ниже 5 после ресуспендирования могут давать ложноотрицательные результаты. Образцы, обработанные формалином, могут давать ложноположительные результаты. Отрицательные результаты данного анализа не исключают инфекции.

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

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

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

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.438	0.099	6.86
2	1.007	0.065	6.41
3	0.673	0.043	6.36
4	0.243	0.012	5.04

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

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.488	0.071	4.77
2	1.034	0.048	4.64
3	0.656	0.051	7.77
4	0.246	0.027	10.9

Нижний предел обнаружения

Нижний предел обнаружения антигена *Giardia lamblia* в Serazym® *Giardia lamblia* определяется путем титрования проб фекалий, в которые были введены цисты *Giardia lamblia* и трофозоиты культур. Нижний предел обнаружения составил:

5.0X10³ кисты и
2.5X10⁴ трофозоиты на мл суспензии кала.

Специфичность и чувствительность

Было протестировано 409 образцов кала параллельно данным методом Serazym® *Giardia lamblia* и FIT:

	FIT положительные	FIT отрицательные
Serazym® ELISA положительные	39	2
Serazym® ELISA отрицательные	1	367

Специфичность: 99.5 % Чувствительность: 97.5 %

Перекрестная реактивность

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

Adenovirus, Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Cryptosporidium parvum, Entamoeba dispar, Entamoeba histolytica, Rotavirus

Негативные образцы кала насыщались ≥ 10⁸ КОЕ микроорганизмами (см. табл. в оригинале инструкции стр. 3) и протестированы с отрицательным результатом данным набором (<Cut-off).

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
www.biotechlab.com.ua