

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСТРОВИРУСА В ОБРАЗЦАХ КАЛА

E-045, Astrovirus

Каталог. № : E-045

Методика от 01-06-2013

Количество : 96

Производитель: **Seramun Diagnostica GmbH, (Германия)**



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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Astrovirus был впервые описан в 1975 году и получил название благодаря своей звездообразной структуре, видимой под электронным микроскопом. Астровирус принадлежит семейству *Astroviridae*. Человеческие астровирусы подразделяются на 7 серотипов (1). Вместе с ротавирусами и аденовирусами, астровирусы являются одной из наиболее частых причин гастроэнтеритов не бактериального происхождения у детей до 5 лет во всем мире. Так, 80 % детей в возрасте 5 – 10 лет имеют положительные результаты определения антител к астровирусу. Астровирус вызывает гастроэнтериты у взрослых, также наблюдаются нозокомиальные инфекции (2). Течение заболевания обычно самоограничивающееся и длится короткий период. После инкубационного периода в 1-2 дня развивается гастроэнтерит, продолжающийся 1-4 дней, сопровождающийся рвотой, диареей, лихорадкой и абдоминальной болью, в итоге вызывающими обезвоживание. Хотя астровирусные инфекции наблюдаются в течение всего года, встречаемость в основном приходится на зимний период (3,4). Астровирусные инфекции передаются фекально-оральным путем от человека к человеку или через зараженные вещи или пищу. Инфицированный человек экскретирует большое количество вирусных частиц с фекалиями (1,2). Выявление астровируса может быть выполнено методом электронной микроскопии или с помощью молекулярно-биологических методов, таких как ПЦР.

При этом иммунологические методы, такие как иммуноферментный анализ, представляются более предпочтительными для рутинной лабораторной диагностики, так как они быстрее, экономичнее и возможна их полная автоматизация (1).

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор *Serazym® Astrovirus* предназначен для прямого определения *Astrovirus* в образцах кала с целью диагностики *in vitro*.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор *Serazym® Astrovirus* представляет собой быстрый одношаговый иммуноферментный метод, основанный на использовании поли- и моноклональных антител. Разведенные образцы кала и конъюгированные с HRP моноклональные антитела к астровирусу одновременно вносят в лунки микропланшета, покрытые поликлональными антителами к астровирусу.

После инкубации в течение 60 минут при комнатной температуре (RT) при промывке из лунок удаляются не связавшиеся компоненты. Затем в лунки добавляется бесцветный раствор субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB), который HRP в течение 10 минут инкубации при комнатной температуре в защищенном от света месте превращает в голубой продукт. Энзиматическая реакция останавливается добавлением в лунки серной кислоты, и цвет раствора изменяется с голубого на желтый.

Оптическая плотность (OD) раствора, считываемая при длине волны 450/620 нм, прямо пропорциональна количеству специфически связанного *Astrovirus*.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Компонент набора (96 лунок)	Количество
1. Микропланшет «WELLS» 12 отдельных ломаемых 8-луночных стрипа (всего 96 лунок), покрытых поликлональными антителами анти-Astrovirus.	1 планшет в вакуумной упаковке с осушителем, светлосинего цвета
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 Желтого цвета Черная крышка
4. Положительный контроль Реактивный образец Astrovirus ELISA	1.5 мл Готов к использованию Синего цвета Красная крышка
5. Отрицательный контроль Отрицательный образец Astrovirus ELISA	1.5 мл Готов к использованию Синего цвета Зеленая крышка
6. Конъюгат HRP «CONJ HRP» HRP-меченые моноклональные антитела к анти-Astrovirus (мышинные)	12 мл Готов к использованию Зеленого цвета 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» 1.0 М фосфорная кислота	15 мл Готов к использованию Желтая крышка

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. Возможно более длительное хранение при -20°C. Избегайте повторных циклов замораживания-оттаивания.

Образцы, разведенные с разбавителем, могут храниться при 2-8 °C до 72 часов.

Подготовка

Дайте замороженным образцам быстро оттаять. Нагрейте образцы до комнатной температуры и тщательно перемешайте.

Тестирование может проводиться с разбавлением образцов 1:6 и 1:11. В случае дополнительного тестирования одного и того же образца *Serazym Campylobacter* или *Serazym Clostridium difficile Toxin A+B ELISA* рекомендуется разведение 1:6.

Подготовка разведения образца 1:11

Внесите по 1000 мкл буфера для разведения образцов в чистые пробирки. Используя одноразовые стеклянные палочки, перенесите примерно 100 мг (диаметр примерно 2-3 мм) образцов кала (если они твердые) или пипетируйте по 100 мкл (если жидкие) в пробирку и тщательно ресуспендируйте, например, на вортексе. Если необходимо, осадите плавающие частицы центрифугированием.

Подготовка разведения образца 1:6

Внесите по 1000 мкл буфера для разведения образцов в чистые пробирки. Используя одноразовые стеклянные палочки, перенесите примерно 200 мг (диаметр примерно 4-6 мм) образцов кала (если они твердые) или пипетируйте по 200 мкл (если жидкие) в пробирку и тщательно ресуспендируйте, например, на вортексе. Если необходимо, осадите плавающие частицы центрифугированием.

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 более
- ✓ 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. Приготовленный для использования промывочный раствор стабилен как минимум 1 месяц при 2- 8 °C.

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 защищенными 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 или деионизированной воды.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1:11 или 1:6, например, 100 мг или 100 мкл образца кала + 1.0 мл (1:11) буфера для разведения образцов (3) или 200 мг или 200 мкл образца кала + 1.0 мл (1:6) буфера для разведения образцов (3)
- Избегайте даже незначительного сдвига времени при внесении реагентов и образцов.
- Убедитесь, что время замачивания (нахождение буфера для промывки в лунках) составляет не менее 5 секунд на каждый цикл промывки!
- Избегайте попадания света на раствор субстрата ТМВ!

ВЫПОЛНЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

- Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °С). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
- Внесите **2 капли (или 75 мкл) «CONJ HRP» (6)** в каждую лунку и
- Внесите **75 мкл положительного контроля «CONTROL +» (4) отрицательного контроля «CONTROL -» (5) 50 мкл** разведенного образца, аккуратно перемешать.
- Закройте планшет и инкубируйте **60 мин** при 22- 25 °С.
- Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку **5 раз**, используя по **300 мкл** буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
- Внесите **2 капли (или 75 мкл) «SUBSTR TMB» (7)** в каждую лунку
- Закройте планшет и инкубируйте **10 мин** при 22-25 °С защищая от света.
- Внесите **2 капли (или 75 мкл) «STOP» (8)** в каждую лунку
- Считайте ОП при длине волны **450 нм** (длина волны сравнения ≥ 620 нм) с помощью микропланшетного ридера в течение 30 минут после остановки реакции.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качественная оценка

Определение уровня «cut-off»:

ОП отрицательного контроля + 0.10

Образцы, для которых ОП равна или выше значения «cut-off» должны быть признаны положительными, а образцы, для которых ОП ниже на 10% значения «cut-off» должны быть признаны отрицательными на содержание антигена *Astrovirus*.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Serazym® *Astrovirus*

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.

Контроль качества

Данный тест считается действительным только в случае, если:

- Средняя ОП отрицательного контроля
 ≤ 0.15 (для ручной процедуры)
 ≤ 0.30 (для автоматической процедуры)
- Средняя ОП положительного контроля
 ≥ 1.00

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.

Отрицательные результаты данного анализа не исключают инфекции.

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 с 10 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

(см. оригинал инструкции, стр.6)

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Воспроизводимость

Коэффициент вариации внутри серии (CV) при тестировании данным методом *Serazym*® *Astrovirus ELISA* рассчитан из анализа 8 повторов образцов:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.667	0.148	8.9
2	0.994	0.063	6.4
3	0.443	0.027	6.1
4	0.185	0.018	9.8

Коэффициент вариации между сериями (CV) при тестировании данным методом *Serazym*® *Astrovirus ELISA* рассчитан из анализа в 6 различных постановках по 8 повторов каждого образца:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.853	0.071	3.8
2	1.019	0.059	5.8
3	0.583	0.069	11.9
4	0.350	0.034	9.7

Нижний предел обнаружения

Составляет 6 нг/мл.

Специфичность и чувствительность

Было протестировано 98 образцов кала параллельно данным методом *Serazym*® *Astrovirus ELISA* и другим коммерчески доступным методом ELISA:

	Другой ELISA положительные	Другой ELISA отрицательные
<i>Serazym</i>® ELISA положительные	49	0
<i>Serazym</i>® ELISA отрицательные	2	47

Специфичность: 100 %

Чувствительность: 96 %

Перекрестная реактивность

Не было выявлено какой-либо перекрестно реактивности при тестировании данным методом *Serazym*® *Astrovirus ELISA* образцов кала, положительных по перечисленным ниже кишечным инфекциям: *Staphylococcus aureus*, *enterotoxin forming*; *EHEC*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec. Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Негативные образцы кала насыщались $\geq 10^8$ КОЕ микроорганизмами (см. табл. в оригинале инструкции стр. 7) и протестированы с отрицательным результатом данным набором (<Cut-off). Хотя в некоторых публикациях описана перекрестная реактивность токсинов некоторых штаммов *C.sordellii* с антителами к токсинам *C. difficile*, не наблюдалось перекрестной реактивности с данным набором *C.sordellii* штамм ATCC 9714.

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 обычные 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.



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