

НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО СКРИНИНГА АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К TRICHINELLA В СЫВОРОТКЕ

EIA-3521, Trichinella spiralis IgG ELISA

Каталог. № : EIA-3521
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 15-06-2011
Версия 4.0



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

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Иммуноферментный анализ для качественного скрининга антител класса IgG к *Trichinella* в сыворотке.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Трихинеллез – это инвазия, вызываемая нематодой *Trichinella spiralis*, которая попадает в пищеварительный тракт из сырого или недожаренного мяса (преимущественно свинины). Хотя эти нематоды встречаются повсеместно в животном мире, домашние свиньи – первичный источник инвазии у развивающихся наций. Серология была важным инструментом в диагностике трихинеллеза в течение нескольких десятилетий. Использовались различные методы, такие как ИФА, латексная агглютинация (ЛА), непрямая гемагглютинация (НГА) и бентонитовая флокуляция (БФ). Несмотря на то, что были обнаружены различные классы антител, ни один из них не превосшел другие по диагностической значимости.

БФ был методом выбора в серологии, но его недостатки – отсутствие специфичности реакции, недостаток чувствительности (измеряемые антитела не появлялись до 3 – 4 недель после инвазии) и сложность постановки. Недавно из личинок от инфицированных свиней был очищен экскреторно-секреторный (ЭС) антиген. Этот антиген высоко специфичен к *T. spiralis* и был использован в некоторых крупных исследованиях.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Микротитровальные лунки покрыты экскреторным антигеном *Trichinella*. Во время первой инкубации с разведенными образцами сыворотки пациента, любые антитела, вступающие в реакцию с антигеном, свяжутся с покрытыми лунками. После промывки (для удаления остатков образца) добавляется Ферментный Конъюгат. В случае если антитела связались с лунками, то ферментный конъюгат свяжется с этими антителами. После второй промывки добавляется хромоген (тетраметилбензидин или ТМБ). В присутствии ферментного конъюгата, пероксидаза катализирует реакцию, которая поглощает перекись и меняет окрашивание хромогена на голубое. Для остановки индикаторной реакции добавляется стоп раствор, в результате чего голубое окрашивание меняется на желтое. Реакцию можно увидеть как наглядно, так и с помощью ELISA ридера.

РЕАГЕНТЫ

- Тест полоски: микролунки, содержащие антигены *Trichinella* – 96 или 48 тест лунок в держателе тест полосок.
- Ферментный конъюгат: один флакон, содержащий 11 мл Протеина А, конъюгированного к пероксидазе.
- Положительный контроль сыворотки: один флакон, содержащий 1 мл разведенной положительной кроличьей сыворотки.
- Отрицательный контроль сыворотки: один флакон, содержащий 1 мл разведенной отрицательной сыворотки человека.
- Хромоген: один флакон, содержащий 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМБ).
- Промывочный раствор (20X): один флакон, содержащий 25 мл концентрированного буфера и ПАВ.
- Буфер для разведения: два флакона, содержащие 30 мл буферного раствора протеина.
- Стоп раствор: один флакон, содержащий 11 мл 0.73 М фосфорной кислоты.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не рекомендуется использовать мутные растворы или те, в которых содержится осадок. Промывочный концентрат может

кристаллизоваться при хранении при температуре 2-8° С. Кристаллизация исчезнет после растворения концентрата для работы с ним.

- Не рекомендуется использовать сыворотку, побуждающую рост микробов или же мутную из-за высокого содержания липидов. Перед использованием образцы с высоким содержанием липидов необходимо очистить.
- С сывороткой необходимо обращаться как с инфицированным веществом. Отрицательный контроль был протестирован и определен как отрицательный к поверхностному антигену гепатита В и к антителу к ВИЧ. Этот продукт необходимо использовать в соответствии с определенными мерами безопасности.
- Не следует добавлять азиды в образцы, или какие-либо реагенты.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, стрипы и компоненты, содержащиеся во флаконах:

- Хранить при температуре 2 - 8° С.
- Мягкий флакон, содержащий разведенный промывочный буфер, можно хранить при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА

Промывочный буфер – Добавить содержимое флакона с 475 мл в воду, содержащую реагенты. Поместить разведенный промывочный буфер в гибкий флакон с узким горлышком.

Замечание: Промывка состоит из следующих этапов: наполнение каждой лунки до краев, перемешивание содержимого и повторного наполнения лунок.

Во время промывки избегайте образования в лунках пузырьков.

ЗАБОР И ПОДГОТОВКА СЫВОРОТКИ

Дать крови свернуться и извлечь сыворотку. Заморозить образец до -20° С или ниже, в случае, если образец не используется.

Не нагревать инактивированную сыворотку и избегать повторного замораживания образцов.

Тест образцы: приготовить 1:64 раствора сыворотки пациента, используя буфер для разведения (напр. 5 мкл сыворотки и 315 мкл буфера для разведения).

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Материалы, поставляемые в наборе

Набор ELISA *Trichinella* Serology Microwell

Необходимые материалы, не поставляемые в наборе

1. Пипетки
2. Гибкий флакон для промывки стрипов (рекомендуется с узким горлышком)
3. Вода, содержащая реагенты и градуированная емкость
4. Пробирки для разведения образцов
5. Промокательная бумага

Дополнительные рекомендуемые материалы

Планшетный ридер ELISA с 450 нм и фильтр на 650 - 620 нм (данные компоненты необязательны, если результаты можно увидеть наглядно).

ВЫПОЛНЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Необходимое количество лунок (две для контролей плюс количество образцов) поместить в держатель.
2. Добавить 100 мкл (или же 2 капли) отрицательного контроля в лунку №1, 100 мкл положительного контроля в лунку №2 и 100 мкл разведенных (1:64) тестовых образцов в оставшиеся лунки.

Замечание: Отрицательный и положительный контроли поставляются уже в разведенном виде. Не следует повторно разводить их.

3. Инкубировать при комнатной температуре (15 до 25° С) 10 минут.
4. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза разведенным промывочным буфером.
5. Добавить 2 капли ферментного конъюгата в каждую лунку.
6. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.
7. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза промывочным буфером. Удалить остатки жидкости с помощью бумажного полотенца.
8. Добавить 2 капли хромогена в каждую лунку.
9. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.
10. Добавить 2 капли стоп раствора и тщательно смешать.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Визуально: Посмотрите на каждую лунку на белом фоне (напр. бумажное полотенце) и запишите +, ++ или же +++ реакции.

ELISA Ридер: Обнулите ридер по воздуху. Установите для бихроматических считываний при 450/650-620 нм.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Серологические результаты не рекомендуется использовать как единственный диагностический метод.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование контролей способствует стабильности набора. Не рекомендуется использовать набор, если хотя бы один из контролей находится вне предполагаемого предела. Ожидаемые значения для контролей следующие:

Отрицательные – от 0.0 до 0.3 единиц оптической плотности.

Положительные - 0.5 единиц оптической плотности и выше.

ВЫЯВЛЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Отрицательный контроль после проявления имеет насыщенный цвет.

Причина: недостаточно промывок.

Устранение: промыть тщательнее. Извлечь остатки жидкости из лунок, выстучав ее на промокательную бумагу. Не дать лункам полностью высохнуть.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - ELISA РИДЕР

Нулевой ELISA ридер. Считать все лунки при 450/650-620 нм.

Положительное – считывание оптической плотности соответствует или превышает 0.3 ОП единиц.

Отрицательное - считывание оптической плотности менее чем 0.3 ОП единиц.

Отрицательное считывание ОП указывает на то, что у пациента не обнаружено открытого уровня антител. Причиной тому может служить отсутствие инфекции или же слабая иммунная реакция пациента.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - НАГЛЯДНО

Сравните результаты с контролями. Образец необходимо рассматривать как положительный в случае значительного и явного проявления цвета.

ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Количество людей с положительными результатами может значительно изменяться в зависимости от населения и географических районов проживания. По возможности, каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои предполагаемые пределы обследуемой группы больных.

ДАННЫЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Исследование №1: Референс Центр Канады

Сравнение DRG ELISA с другой коммерческой продукцией ELISA. Обнаружено соответствие 85.4% (N=82).

Исследование №2: Центр Контроля и Профилактики Заболеваний (CDC&P)

| | | CDC&P | |
|---------|---|-------|----|
| | | + | - |
| EIA-352 | + | 43 | 1 |
| | - | 2 | 15 |

Чувствительность (биопсия положительная) 94,4% (17/18).

Чувствительность (вспышка симптомов) 96,3% (26/27).

Специфичность

Нормальные 93,8% (15/16)

Аскарида 100% (6/6)

Плоские черви 83,3% (5/6)

Угрица 83,3% (5/6)

Токсокара 66,6% (5/6)

Власоглав 83,3% (5/6)



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