



ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ROTAVIRUS В ОБРАЗЦАХ КАЛА

Кат. № : E-020
Количество тестов: 96
Производитель : Seramun Diagnostica GmbH, (Германия)

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

Методика от 15-08-2012

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Ротавирусы группы А являются наиболее распространенной причиной бактериального гастроэнтерита у младенцев и маленьких детей в возрасте от 4 месяцев до 3-х лет (1-5). Ротавирус выделяется в кишечник в больших количествах (10^9 - 10^{11} вирусных частиц на грамм стула). Нозокомиальные инфекции являются причиной многих проблем, особенно в родильных отделениях и в детских больницах (3).

Ротавирусная инфекция также может быть причиной диареи путешественников у взрослых, а также была обнаружена в образцах кала бессимптомных носителей (1). Ротавирусная инфекция передается фекально-оральным путем от человека к человеку или через загрязненные объекты. В умеренном климате Ротавирусные инфекции в основном наблюдаются в зимние месяцы (1).

В связи с тем, что культивация вируса в первичных клетках почек или линиях перманентных клеток является длительным процессом, эти методы не имеют диагностического значения. Золотой стандарт является прямым методом обнаружения вируса с помощью электронной микроскопии. (1,2). Между тем, были установлены методы выявления антигенов на основе иммунологических методов, таких как тесты агглютинации или иммуноферментного анализа, с использованием поликлональных или моноклональных антител к специфическому антигену группы А (VP-6) (1-5).

НАЗНАЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Набор **Serazym® Rotavirus** предназначен для использования в in-Vitro диагностике для прямого определения *Ротавируса* в образцах кала.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Serazym® Rotavirus это иммуноферментный одношаговый анализ, основанный на поликлональных антителах к группе специфических антигенов VP-6, которые являются значительным протеином Ротавируса группы А.

Разведенные образцы стула и пероксидаза хрена, меченая поликлональными антителами к анти-Ротавирусу, помещают в лунки планшета, покрытые антителами анти-Ротавируса. После инкубации, которая длится 60 минут при комнатной температуре, несвязанные компоненты удаляются из лунок при промывке.

HRP преобразует последовательно добавленный бесцветный раствор субстрата 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в течение 10 минут при комнатной температуре, защищенный от света, в синий продукт. Ферментная реакция останавливается добавлением серной кислоты в лунки, окрашивая раствор из синего в желтый.

Оптическая плотность (ОП) раствора, считываемая при 450/620 нм, прямо пропорциональна специфически связанному количеству антигена *Ротавируса*. Учитывая предельные значения, результаты интерпретируются как положительные или отрицательные.

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.

Подготовка

Быстро разморозьте замороженные образцы. Нагрейте образцы до комнатной температуры и тщательно перемешайте.

ИФА **Serazym® Rotavirus** может проводиться с разбавленными образцами в двух вариантах – 1:6 или 1:11. В случае дополнительного тестирования того же образца в анализе **Serazym® Campylobacter** или **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B ELISA** рекомендуется разбавление 1:6.

Подготовка разбавления 1:11:

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 1 минуты.

Подготовка разбавления 1:6:

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
1. Микропланшет «WELLS» 12 отдельных локоточных стрипа (всего 96 лунок), покрытых овечьими поликлональными антителами анти-Ротавирус	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 Желтого цвета Черная крышка
4. Положительный контроль Реактивный образец Ротавируса	1,5 мл Готов к использованию Синего цвета Красная крышка
5. Отрицательный контроль Образец негативный Ротавируса	1,5 мл Готов к использованию Синего цвета Зеленая крышка
6. Конъюгат HRP «CONJ HRP» Поликлональные антитела анти-Ротавирус (кролик), меченные HRP	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» 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 бутыль 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 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 воды.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Разведите образцы буфером для образцов (3) в соотношении 1:11 или 1:6, например, 100 мг или 100 мкл образца + 1.0 мл (1:11) буфера для разведения (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 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 ТМВ!

Выполнение процедуры

1. Перед началом тестирования все компоненты набора должны достичь комнатной температуры (22-25 °C). Аккуратно перемешайте, без образования пены.
2. Внесите 2 капли (или 75 мкл) «CONJ HRP» (6) и
3. Внесите 75 мкл Положительного контроля «CONTROL +» (4) Отрицательного контроля «CONTROL -» (5) 50 мкл разведенных образцов кала, аккуратно перемешайте
4. Закройте планшет и инкубируйте 60 мин при 22-25 °C.
5. Удалите жидкость декантированием, затем промойте каждую лунку 5 раз, используя по 300 мкл буфера для промывок (разведенного (2)) на лунку на один цикл промывки.
6. Внесите 2 капли (или 75 мкл) «SUBSTR TMB» (7)
7. Закройте планшет и инкубируйте 10 мин при 22-25 °C защищая от света.
8. Внесите 2 капли (или 75 мкл) «STOP» (8) в каждую лунку, аккуратно перемешайте.
9. 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 отрицательно 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 антигена Ротавируса.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**Serazym® Rotavirus**

Отрицательные	\leq Cut-off
Положительные	\geq 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

≥ 1.20

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 Ротавируса.

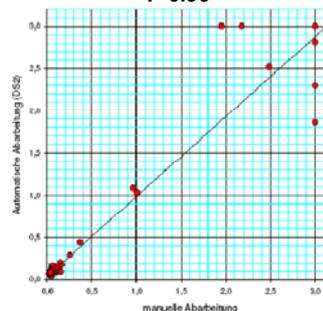
При интерпретации любых результатов исследований методом ИФА (ELISA) необходимо учитывать результаты микробиологических исследований и полную клиническую картину.

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® Rotavirus
Корреляция плотностей (n=133 образца)
r=0.96



Было проведено параллельное исследование 133 образцов кала в ручной и автоматизированной обработке.

Коэффициент корреляции составил $r = 0,96$.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**Воспроизводимость**

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

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	1.841	0.137	7.45
2	1.208	0.078	6.50
3	0.620	0.040	6.38
4	0.463	0.024	5.26

Коэффициент вариации между сериями (CV) при тестировании данным методом Serazym® Rotavirus рассчитан из анализа в 10 различных постановках по 3 повтора каждого образца:

Образец	Средняя ОП	Стандартное отклонение	CV (%)
1	2.720	0.128	4.71
2	1.647	0.122	7.38
3	0.968	0.074	7.69
4	0.409	0.019	4.58

Нижний предел обнаружения

Нижний предел обнаружения определяется путем титрования очищенного антигена Ротавируса SA-11: < 10 нг/мл соответственно к106 частиц вируса/г кала.

Специфичность и чувствительность

Было протестировано 488 образцов кала параллельно данным методом Serazym® Rotavirus и другим коммерчески доступным ИФА.

	Сравнительный ИФА положительный	Сравнительный ИФА отрицательный
Serazym® ELISA положительный	246	0
Serazym® ELISA отрицательный	4	238

Специфичность: 100 %

Чувствительность: 98.4%

Перекрестная реактивность

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

Adenovirus (n=20), *Astrovirus* (n=8), *Norovirus* (n=31), *Clostridium difficile* (n=11), *Campylobacter jejuni* (n=7), *Campylobacter coli* (n=1), *Salmonella enteritidis* (n=18), *Giardia lamblia* (n=1) и образцы кала (n=93) с уровнями обнаружения (> 10 мкг/г) гемоглобина.

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 7966)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11773)	<i>Feptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	<i>Salmonella enterica Serovar enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 39559)	<i>Salmonella enterica Serovar typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 39201)	<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)	<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Clostridium sorbitoli</i>	(ATCC 9714)	<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13043)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)	<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical isolate
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)	<i>Yersinia enterocolitica Serotyp 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
www.biotechlab.com.ua