

**НАБОР ИФА
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИГЕНОВ *Cryptosporidium*
В ОБРАЗЦАХ КАЛА ЧЕЛОВЕКА**

734-01, CoproELISA *Cryptosporidium*

Каталог. № : 734-01
Количество : 96
Производитель: **Savyon Diagnostics
Ltd., (Израиль)**

Методика от 06-01-2012



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

Для использования в in-Vitro диагностике

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор CoproELISA™ *Cryptosporidium* является тестом для иммуноферментного анализа (ELISA) по обнаружению антигенов Криптоспоридия в образцах человеческих фекалий, взятых у больных с симптомами желудочно-кишечных заболеваний. Тест может быть использован для фекальных образцов, предназначенных для рутинного клинического тестирования взрослых или детей.

Для In-Vitro диагностического использования.

ПРИНЦИП МЕТОДА

1. Пластины покрыты специфическими поликлональными антителами к *Cryptosporidium*.
2. Тестируемые образцы кала разводятся и инкубируются в лунках микропланшета. На этом этапе антигены *Cryptosporidium* связываются с иммобилизованными антителами.
3. Не специфические антигены удаляются при промывке.
4. Моноклональные антитела к анти-*Cryptosporidium*, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), добавляются и инкубируются. На этом этапе конъюгат с HRP связывается с образовавшимся ранее комплексом антиген-антитело.
5. Не связавшийся конъюгат удаляется при промывке.
6. Субстрат ТМВ добавляется и гидролизуется пероксидазой, с образованием голубого раствора восстановленного субстрата.
7. После добавления стоп-раствора голубое окрашивание преобразуется в желтое. Затем измеряется абсорбция полученного раствора с помощью ИФА анализатора при длине волны 450/620 нм.
8. Полученные значения абсорбции пропорциональны уровню клеток *Cryptosporidium*, присутствующих в образце.

СУММАРНАЯ ПРОЦЕДУРА РУЧНОГО/АВТОМАТИЧЕСКОГО* МЕТОДА

Лунки микропланшета, покрытые антителами к анти-*Cryptosporidium*
↓
Внесите 2 x 100 мкл Отрицательного контроля (*Растворитель для кала*), 100 мкл Положительного контроля и 100 мкл разведенных образцов
↓
Закройте микропланшет и инкубируйте 1 час при 37°C и 100% влажности
↓
Промойте 5 раз промывающим буфером (300 мкл)
↓
Внесите 100 мкл конъюгата HRP (Готового к использованию)
↓
Закройте микропланшет и инкубируйте 1 час при 37°C и 100% влажности
↓
Промойте 5 раз промывающим буфером (300 мкл)
↓
Внесите 100 мкл субстрата ТМВ
↓
Закройте микропланшет и инкубируйте 15 минут при комнатной температуре
↓
Внесите 100 мкл стоп-раствора

↓
Считайте абсорбцию при длине волны 450/620 нм

↓
Рассчитайте и интерпретируйте результаты

***Автоматическая процедура:**

- 50 минут инкубация образца
- Объем промывочных циклов: 500 мкл/лунку
- 10 минут инкубация субстрата

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА ДЛЯ РУЧНОГО/АВТОМАТИЧЕСКОГО* МЕТОДА

Набор предназначен для 96 определений

1. **Микропланшет, лунки которого покрыты поликлональными антителами к *Cryptosporidium*:** 96 лунок на «ломаемых» стрипах (8x12), покрытых антителами к *Cryptosporidium*, упакованные в алюминиевый пакет, содержащий осушитель.
а. 1 Планшет/1 Планшет
2. **Концентрированный промывочный буфер (20 X) :** PBS - Tween буфер.
1 флакон, 100 мл/1 флакон, 100 мл
3. **Разбавитель образцов кала:** Буферный раствор, готов к использованию. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта. Растворитель также предназначен для использования как раствор отрицательного контроля.
1 флакон, 60 мл/ 2 флакона, 50 мл
4. **HRP-конъюгат (Зеленый):** Готовый к использованию раствор, содержащий пероксидазу хрена (HRP), конъюгированную моноклональным антителом анти-*Cryptosporidium*. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.
1 флакон, 12 мл/1 флакон, 16 мл
5. **Положительный контроль:** Готовый к использованию раствор, содержащий антиген *Cryptosporidium*. Содержит менее 0.05% Проклина в качестве консерванта.
1 флакон, 2.5 мл/1 флакон, 2.5 мл
6. **Субстрат ТМВ:** Готов к использованию. Содержит 3, 3', 5, 5' – хромоген тетраметилбензидин в качестве хромогена и пероксидазу в качестве субстрата.
1 флакон, 14 мл/1 флакон, 16 мл
7. **Стоп-раствор:** Готов к использованию. Содержит 1M H₂SO₄.
1 флакон, 15 мл/1 флакон, 16 мл
8. **Одноразовые пластиковые пипетки:** **100 штук/нет**
9. **Пленка для запечатывания микропланшета:** **1 штука/нет**
10. **Инструкция:** **1 штука/1 штука**

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ:

1. Чистые пробирки для разведения образцов кала.
2. Регулируемые микропипетки, или многоканальные пипетки (с диапазонами 50-200 и 200-1000 мкл) и одноразовые наконечники.
3. Одноразовые пластиковые/деревянные коллекторы или чайные ложки.
4. Литровая мерная колба.
5. Один 50 мл мерный цилиндр.
6. Промывочная бутылка.
7. Фильтровальная бумага.
8. Вortex.
9. 37 °C водяная баня с крышкой или влажная камера, расположенная в 37 °C инкубаторе.
10. ИФА ридер, оснащенный 450/620 нм фильтрами.
11. Дистиллированная или дважды деионизированная вода.
12. **Для автоматического использования:** центрифуга, оснащенная ротором, совместимым с пробирками для образцов, которые будут использоваться в автоматической процедуре.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Контроль данного набора содержит антиген *Cryptosporidium*, который был инактивирован, чтобы избежать распространения инфекции. Тем не менее, со всеми компонентами Контроля, поставляемыми в данном наборе, необходимо обращаться как с потенциально инфекционными агентами, в соответствии с рекомендациями, опубликованными в руководстве CDC/NIH «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях, 1988".
2. Реагенты должны быть доведены до комнатной температуры перед использованием.
3. При работе с лунками, избегать царапин в нижней части скважины, поскольку это может привести к повышению оптической плотности.
4. Образцы стула, микролунки, наконечники и одноразовые коллекторы кала и пробирки требуют обхождения и

уничтожения как потенциально опасные. Надевайте перчатки при выполнении теста.

5. **Неиспользуемые лунки должны быть возвращены в закрывающийся мешок с осушителем, чтобы защитить их от влаги.**
6. Раствор ТМВ субстрата оказывает раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки. Избегайте прямого контакта.
7. Разбавленная серная кислота (1М H₂SO₄) является раздражающим агентом для глаз и кожи. В случае попадания в глаза, немедленно промойте участок водой и обратитесь к врачу.

ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

1. Дата истечения срока действия указана на этикетке. Срок годности для каждого компонента указан на этикетках. Набор хранить при 2-8 °С и вернуть в холодильник как можно быстрее после использования. Хранение компонентов в оригинальной упаковке или герметично закрытыми при температуре окружающей среды в течение нескольких часов не может привести к повреждению реагентов. **НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ!**
2. Неиспользованные стрипы должны быть закрыты в алюминиевую упаковку с осушителем.

СБОР ОБРАЗЦОВ КАЛА

1. Стандартные процедуры сбора и обработки, используемые для фекальных образцов являются соответствующими.
2. **Консервированный образец стула:** тест совместим с образцами, которые были зафиксированы в 10% формалине или в Формалине ацетата натрия (SAF). Законсервированные образцы можно хранить при комнатной температуре в течение 24 месяцев. *Тест не совместим с образцами стула, зафиксированными в поливиниловом спирте (ПВС).*
3. **Неконсервированные образцы:** неконсервированные образцы должны храниться при 2- 8 °С и проанализированы в течение 48 часов после сбора. Если тестирование не может быть выполнено в течение 48 часов, хранить образцы при -20 °С₁ или ниже.
4. Замораживание и оттаивание образцов, особенно несколько раз, может привести к потере активности из-за деградации или протеолиза антигенов.

РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА

А. Подготовка реагентов

1. Все компоненты набора и образцы должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Определите общее количество образцов, которое необходимо протестировать. Кроме образцов, в каждую постановку необходимо включать: одну лунку для отрицательного контроля (Использовать разбавитель образца кала для этих целей) и одну лунку для положительного контроля.
2. Достаньте микропланшет из алюминиевого пакета, для этого разрежьте один из его краев. Вставьте необходимое количество стрипов (в соответствии с количеством тестируемых образцов) в держатель.
3. Разведите концентрат промывочного буфера в соотношении 1:20 дважды деионизированной или дистиллированной водой. Например, для приготовления 1 литра промывочного буфера добавьте 50 мл концентрата к 950 мл дважды деионизированной или дистиллированной воды.

В. Работа с образцом

4. Приготовьте одну пробирку для каждого тестируемого образца. Рекомендуется использование 1.5 мл пробирок Эппендорфа. Добавить 400 мкл Разбавителя образцов в каждую пробирку. Подписать пробирку.
5. **Тщательно перемешать (при помощи вортекса) фекальный образец для обеспечения адекватной выборки.**
6. **Твердые образцы:** Используйте деревянный коллектор или одноразовую чайную ложку для переноса фекального образца в пробирку. Поместить примерно от 0,1- 0,15 г образца (размером с небольшую горошину) в разбавитель образцов. Перемешать коллектор в Разбавителе образцов, чтобы взять как можно больше образца, и выжать коллектор об стенку пробирки, чтобы удалить любую остаточную жидкость.
Жидкие образцы: Поместить 150 мкл образца в пробирку. Убедитесь, что жидкие образцы равномерно перемешаны.
7. Оставить пробирки, по крайней мере, на 10 минут, но не более, чем на 30 минут, пока большие твердые частицы не осядут. Используйте верхнюю жидкую фазу для тестирования. **НЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЦЕНТРИФУГУ ДЛЯ ЭТОЙ ПРОЦЕДУРЫ.**

С. Инкубация образцов стула и контролей

8. Внесите 100 мкл Положительного контроля и 2x100 мкл (дубликат) Отрицательного контроля (например, Разбавителя образца) в отдельные лунки тест-полоски.
9. Внесите 100 мкл разбавленных образцов стула в отдельные лунки тест-полоски, используя предоставленные одноразовые пипетки (самая низкая отметка на пипетке).
10. Покройте полоски с крышкой и инкубируйте 1 час при 37 °С во влажной камере.
11. **Промывочный шаг:** Удалить содержимое лунок. Заполнить каждую лунку промывочным буфером до конца (300 мкл). Повторить этот шаг 4 раза в общей сложности **ПЯТЬ** раз. Автоматическая промывочная машина может быть использована.
12. Высушить полоски и держатель, осторожно постукивая ими по фильтровальной бумаге.

Д. Инкубация с конъюгатом

13. Внести 100 мкл готового к употреблению конъюгата в каждую лунку.
14. Покрыть полоски крышкой и инкубировать 1 час при 37 °С во влажной камере.
15. Удалить содержимое лунок и промыть **ПЯТЬ** раз как описано в шагах 7-8.

Е. Инкубация с субстратом ТМВ

16. Внесите 100 мкл субстрата ТМВ к каждую лунку, заройте стрипы пленкой и инкубируйте в течение **15 минут** при комнатной температуре.
17. Остановите реакцию, внеся 100 мкл стоп-раствора (1М H₂SO₄) в каждую лунку.

Ф. Определение результатов

18. Определите абсорбцию не позднее, чем через 10 минут после остановки реакции, при длине волны 450/620 нм и сохраните результаты.

Внимание: *Перед считыванием абсорбции убедитесь в отсутствии пузырей на поверхности жидкости в лунках. Дно микропланшета должно быть тщательно высушено.*

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ПРОЦЕДУРА

А. Подготовка реагентов

1. Все компоненты набора и образцы должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Определите общее количество образцов, которое необходимо протестировать. Кроме образцов, в каждую постановку необходимо включать: одну лунку для отрицательного контроля (Использовать разбавитель образца кала для этих целей) и одну лунку для положительного контроля.
2. Достаньте микропланшет из алюминиевого пакета, для этого разрежьте один из его краев. Вставьте необходимое количество стрипов (в соответствии с количеством тестируемых образцов) в держатель.
3. Разведите концентрат промывочного буфера в соотношении 1:20 дважды деионизированной или дистиллированной водой. Например, для приготовления 1 литра промывочного буфера добавьте 50 мл концентрата к 950 мл дважды деионизированной или дистиллированной воды.

В. Работа с образцом

4. Приготовьте одну пробирку для каждого тестируемого образца (используйте пробирки, совместимые с доступным автоматическим оборудованием). Добавить 800 мкл Разбавителя образцов в каждую пробирку. Подписать пробирку.
5. **Тщательно перемешать (при помощи вортекса) фекальный образец для обеспечения адекватной выборки.**
6. **Твердые образцы:** Используйте деревянный коллектор или одноразовую чайную ложку для переноса фекального образца в пробирку. Поместить примерно от 0,2- 0,30 г образца (размером с 2 небольших горошины) в разбавитель образцов. Перемешать коллектор в Разбавителе образцов, чтобы взять как можно больше образца, и выжать коллектор об стенку пробирки, чтобы удалить любую остаточную жидкость.
Жидкие образцы: Поместить 300 мкл образца в пробирку. Убедитесь, что жидкие образцы равномерно перемешаны.
7. Оставить пробирки, по крайней мере, на 10 минут. Центрифугируйте пробирки при 1000 g в течение 30 секунд. Убедитесь, что супернатант не содержит больших частиц.
8. Поместить пробирки с образцами в соответствующий держатель автомата.

С. Инкубация образцов стула и контролей

- Внесите 100 мкл Положительного контроля и 2x100 мкл (дубликат) Отрицательного контроля (например, Разбавителя образца) в отдельные лунки тест-полоски.
- Внесите 100 мкл разбавленных образцов стула в отдельные лунки тест-полоски.
- Покройте полоски с крышкой и инкубируйте **50 минут** при 37 °С.
- Провести промывку 5 x **500 мкл** используя предварительно разбавленный промывочный буфер.
- Выполнить 2 цикла аспирации.

Д. Инкубация с конъюгатом

- Внести 100 мкл готового к употреблению конъюгата в каждую лунку.
- инкубировать 1 час при 37 °С.
- Провести промывочные циклы как описано в шагах 7-8.

Е. Инкубация с субстратом ТМВ

- Внесите 100 мкл субстрата ТМВ к каждую лунку, инкубируйте в течение **10 минут** при комнатной температуре.
- Остановите реакцию, внося 100 мкл стоп-раствора (1М H₂SO₄) в каждую лунку.

Ф. Определение результатов

- Определите абсорбцию при длине волны 450/620 нм и сохраните результаты.

Обратите внимание, что каждая машина имеет конкретные технические команды. Пожалуйста, проводите автоматическую процедуру для данного набора согласно протокола для вашего автоматизированного оборудования.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Для того, что бы результаты тестирования были признаны достоверными, необходимо выполнение следующих критериев. В случае, если какой-либо критерий не выполняется, анализ должен быть признан недействительным и должен быть повторен.

- ОП **положительного контроля** ≥ 1.0 при 450/620 нм.
- ОП **отрицательного контроля**: ≤ 0.25 при 450/620 нм.

РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЯ CUT-OFF

- Необходимо рассчитать среднее значение абсорбции для контроля Cut off, протестированного в дублях.
- Для стандартизации результатов, получаемых в различных постановках, необходимо рассчитать индекс cut off (COV), по следующей формуле:

$$COV = OD \text{ Отрицательного контроля}_{450/620 \text{ нм}} + 0.3$$

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Абсорбция (450/620 нм)	Результаты
ОП < COV	Отрицательный: Антиген cryptosporidium не определяется
ОП \geq COV	Положительный: Значительные уровни Антигена cryptosporidium

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Тест не совместим с образцами стула, законсервированными в поливиниловом спирте (ПВС).
- Консервация кала в растворе формалина/SAF должна давать смесь, содержащую кала до соотношения 1:5 (w:v) в растворе консерванта.
- Положительный результат не исключает присутствия других этиологий. Поэтому рекомендуется принимать во внимание все клинические и лабораторные данные, прежде чем принимать окончательный диагноз и определить соответствующие управления пациента.

ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

В исследовании, проведенном в контрольной лаборатории в США, в общей сложности тестировалось 120 образцов в формалине, SAF, или твердых образцов при помощи теста CoproELISA™ *Cryptosporidium*. Наличие желудочно-кишечных паразитов в этих образцах было предопределено микроскопическим исследованием. Результаты этой оценки показаны в Таблице 1:

Таблица 1

CoproELISA™ <i>Cryptosporidium</i>	Сравнительный ИФА	
	Положительный	Отрицательный
Положительный	60	0
Отрицательный	0	60

Чувствительность: 100 % Специфичность: 100%
PPV: 100 % NPV: 100%

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ И ВМЕШАТЕЛЬСТВО СМЕШАННЫХ ИНФЕКЦИЙ

Тест CoproELISA™ *Cryptosporidium* оценивали с помощью образцов стула, определенных как положительные на различные желудочно-кишечные заболевания. Нет перекрестной реактивности или вмешательства смешанных инфекций с любым из патогенов, перечисленных ниже:

E. histolytica, *E. dispar*, *E. hartmanii*, *Blastocystis* spp. *G. lamblia*, *D. fragilis*, *E. coli*, *E. nana* and *I. butschlii*. *Ascaris*, Hookworm, *T. trichiura*, *S. cayetanensis*. Кроме того, интерференция белых клеток крови не наблюдалась.

ТОЧНОСТЬ

Таблица 2: точность внутри серии показана ниже:

Образец	Кол-во копий	Среднее значение	CV %
Положительный	8	1.48	4.02
Отрицательный	8	0.03	5.99

Таблица 3: точность между сериями показана ниже:

Образец	Кол-во копий	Среднее значение	CV %
Положительный	8	1.47	7.7
Отрицательный	8	0.025	15.6



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com