

НАБОР ИФА

ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG+IgM К ИНФЕКЦИИ LEPTOSPIRA BIFLEXA

8210-35, Leptospira IgG + IgM

Каталог. № : 8210-35

Методика от 30-10-2012

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



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

Анализ	Leptospira IgG/IgM ELISA
Метод	Твердофазный иммуноферментный анализ
Принцип	Непрямой ИФА; планшет, покрытый антигеном
Диапазон обнаружения	Качественный положительный; отрицательный контроль
Образец	10 мкл сыворотки
Специфичность	80%
Чувствительность	88%
Общее время	~40 минут
Срок годности	12 месяцев

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА Leptospira IgG/IgM - иммуноферментный анализ (ELISA), предназначен для определения антител к *Leptospira biflexa* (serovar *patoc 1*) для серологического подтверждения инфекций в сыворотке и плазме. Данный анализ предназначен только для лабораторного использования.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

(См. в оригинале инструкции на англ. языке).

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Принцип ИФА-набора для определения лептоспироза является процессом из трех инкубаций, в котором первая инкубация включает покрытие лунок очищенным антигеном *Leptospira Patoc 1*. В течение первой инкубации с разбавленными сыворотками пациентов любые антитела, взаимодействующие с антигеном связываются с покрытыми лунками. После промывки для удаления остатка образца добавляется ферментный конъюгат. Если антитела закрепятся на лунках, таким образом ферментный конъюгат свяжется с этими антителами. После другой серии промывок добавляется хромоген (тетраметилбензидин/ТМБ). При наличии ферментного конъюгата пероксидаза катализирует реакцию, которая использует пероксид и превращает хромоген из прозрачного в синий. Добавление стоп раствора останавливает реакцию и превращает синий цвет в ярко-желтый. После этого реакцию можно считать визуально или с помощью иммуноферментного считывателя.

РЕАГЕНТЫ

Компонент	Описание
Полоски для анализа	Микролуны, содержащие антиген лептоспироза - 96 лунок в рамке для полосок.
Ферментный конъюгат:	1 бутылка с 11 мл анти-человеческого IgM/IgG антитела, конъюгированного с пероксидазой.
Положительный контроль	1 флакон с 1 мл разбавленной смеси положительного контроля.
Отрицательный контроль	1 флакон с 1 мл разбавленной отрицательной сыворотки человека.
Субстрат ТМБ	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидина (ТМБ).
Промывочный концентрат (20x)	1 бутылка с 25 мл концентрированного фибра и поверхностно-активного вещества.
Буфер для разбавления	2 бутылки с 30 мл раствора буферизованного раствора белка.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 0,73М фосфорной кислоты.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не используйте растворы, если они выпадают в осадок или становятся мутными. Промывочный концентрат может

кристаллизироваться во время хранения при 2-8°C. Кристаллизация исчезает после разбавления до рабочего состояния.

Буфер для разбавления является коллоидным раствором. Он кажется непрозрачным и содержит осадок.

Не используйте сыворотку, которая, возможно, использовалась для поддержки роста микроорганизмов, или мутную сыворотку исходя из насыщенного содержания липидов. Образцы с высоким содержанием липидов должны быть перед использованием очищены.

Обращайтесь со всеми сыворотками как будто с инфекционными.

Отрицательный контроль был проверен необходимыми методами и оказался отрицательным к поверхностному антигену гепатита В и к ВИЧ антигенам.

Это изделие должно использоваться с соблюдением соответствующих условий безопасности, которые использовались бы для любого потенциально инфекционного носителя.

Не добавляйте азиды к любым из реагентов набора.

ХРАНЕНИЕ

1. Реагенты, полоски и компоненты в бутылках хранить при 2-8°C.
2. Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре (15-25°C).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

1. Перед использованием привести все реагенты и образцы к комнатной температуре (15-25 °C) и перемешать.
2. (20x) промывочный концентрат может дать осадок при хранении охлажденным, но вернется к нормальному состоянию при комнатной температуре (15-25 °C) и перемешивании. убедитесь, что (20x) промывочный концентрат полностью вернулся в состояние раствора, перед тем, как разводить его до рабочих концентраций. для разведения (20x) промывочного концентрата до рабочей концентрации, снять крышку, добавить содержимое 1 бутылки промывочного концентрата в гибкую бутылку, содержащую 475 мл дист. воды. перемешать. гибкая бутылка должна иметь узкий наконечник для оптимизации промывки.

СБОР И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Данный анализ необходимо проводить с использованием сыворотки или плазмы. Сыворотка может храниться при 2-8°C до 5 дней. Сыворотку можно заморозить до -20°C при более длительном хранении. Не рекомендуется замораживать образцы цельной крови. Одиночные образцы используются для оценки предрасположения; два образца, собранные в разный период от одних и тех же людей используются для сероконверсии. **Пары образцов необходимо анализировать в одно и тоже время.** Рекомендуется, что бы образец выздоравливающего человека был собран в пациента, демонстрирующего или первоначально неактивный или слабо реактивный результат.

ПРОЦЕДУРА

Поставляемые материалы

Микролуночный ИФА-набор для определения антител класса IgG/IgM к лептоспирозу.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Микропипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок (рекомендуется узкий наконечник).
- Подготовленная для реагентов вода (дистиллированная) и мерная колба.
- Пробирки для разбавления образца.
- Промокательная бумага

Рекомендуемые материалы

Планшеточный ИФА-считыватель для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм (выборочно, результаты могут считываться визуально).

Рекомендуемая температура

Все инкубации проводить при комнатной температуре (15-25 °C).

ПРОЦЕДУРА

Примечания

- Убедитесь, что все образцы и реагенты достигли комнатной температуры (15-25°C).
- Во время процедуры анализа старайтесь избегать образования пузырей в лунках. Они могут повлиять на общую работоспособности считывание конечных результатов. Постукивание лунок об чистое промокательное полотенце после каждого этапа должно помочь минимизировать пузыри в лунках.
- Отрицательные и положительные контроли поставляются разбавленными. НЕ РАЗБАВЛЯТЬ в дальнейшем.

1. Отломите необходимое число лунок (две для контролей и для определенного количества образцов) и поместите в держатель для полосок.
2. Разбавьте в буфере для разбавления сыворотки пациентов 1:40 (напр., 10 мкл сывороток и 390 мкл буфера для разбавления). Добавьте по 100 мкл отрицательного и положительного контроля в лунки № 1 и 2 и по 100 мкл образцов в остальные лунки.
3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут, затем промыть*. После последней стадии промывки постучать лунками о фильтровальное полотенце, чтобы удалить остатки промывочного буфера.
4. Добавить 2 капли ферментного конъюгата в каждую лунку.
5. Инкубировать при комнатной температуре в течение 10 минут, затем промыть*. После последней стадии промывки постучать лунками о фильтровальное полотенце, чтобы удалить остатки промывочного буфера.
6. Добавить 2 капли хромогена в каждую лунку.
7. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.
8. Добавить 2 капли стоп-раствора в каждую лунку. Смешать содержимое лунок, осторожно постукивая по краю полоски указательным пальцем в течение примерно 15 секунд.
9. Читайте в течение одного часа после добавления стоп-раствора.

* Промывка состоит из активного заполнения каждой лунки до краев и удаление содержимого в трех (3) отдельных процедурах. При возможности, избегать образования пузырей в лунках, так как это может повлиять на конечные результаты.

СЧИТЫВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Визуально: посмотрите на каждую лунку против белого фона (например, бумажного полотенца) и зафиксируйте реакцию как чистая или +, ++ или +++.

ELISA считыватель: обнулите считыватель в рабочем режиме. Установите бихроматические считывания при 450/620-650 нм.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование контролей позволяет облегчить проверку стабильности набора. Набор не должен использоваться если любой из контролей выходит за диапазон.

Ожидаемые значения для контролей:

Отрицательный – 0,0 до 0,3 единицы ОП.
Положительный – 0,5 единиц ОП и выше.

ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Отрицательный контроль значительно развил цвет.

Причина: Несоответствующие промывки.

Исправление: Удалите остаток жидкости из лунок постукивая ими на промокательном полотенце. Не позволяйте анализируемым лункам высохнуть.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ АНАЛИЗА

Изначально неактивные: образцы, интерпретируются как отрицательные (0,0 – 0,3 единиц ОП или нулевой цвет) указывают, что антитело не присутствует в образце. Поскольку антитело может не присутствовать во время ранней стадии болезни (5-8 дней инкубация), необходимо подтверждение 2-3 неделями спустя для лабораторного диагноза. В это время пациенты, показывающие слабую реакцию (0,3 - 1,0 ОП или +, ++) должны дальше тестироваться альтернативными методами или повторно тестироваться 10-14 неделями спустя. Выздоровливающая сыворотка при значительной реакции (>1,0 оп) показывает формирование антитела против лептоспиры. Изначально отрицательные результаты с дальнейшими положительными подразумевают сероконверсию.

Изначально слабо реактивные: слабо реактивные образцы должны интерпретироваться с осторожностью. В нормальной популяции слабо реактивные образцы являются нечастыми, но возможными. Рекомендуется использование образцов, собранных 2-3 неделями спустя (пара острой и выздоравливающей сыворотки). >1,0 ОП второго образца подтверждает присутствие недавнего, специфического антитела. (внимание: если это перекрестно реактивное антитело, выздоравливающая сыворотка может не показывать высший уровень антитела, чем острый образец). Если считывание образца остается 0,3 - 1,0 ОП или +, ++ вторая методология должна приниматься или образцы могут интерпретироваться как взятые сверх возрастающего титра (титр уменьшается).

Изначально реактивные: образцы, что интерпретируются как сильно реактивные (> 1,0 ОП или +++), могут указывать на присутствие специфического антитела. Присутствующее антитело

одно не можно использовать для диагностики острой инфекции, поскольку антитела от первого выделения могут циркулировать большой период времени.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Серологические результаты - вспомогательное средство при диагностике, но не могут использоваться как единственный метод диагностики. ELISA был проверен по отношению ко многим серовидам, но не может гарантировать одинакового взаимодействия штаммов. Не используйте в ветеринарных образцах.

Лечение часто проводят до подтверждения серологического диагноза, что требует по крайней мере 2 недели. Острый лептоспироз должен поддаваться лечению немедленно, не ожидая серологического подтверждения. Диагноз инфекции лептоспироза не должен основываться только на результатах ELISA, а вместе с другими клиническими заключениями и симптомами и лабораторными данными. При постановке диагноза должны учитываться эпидемиологические факторы, клинические данные, выделение к эндемическим регионам и другие лабораторные результаты.

При постановке диагноза должны приниматься во внимание эпидемиологические факторы, клинические результаты, предрасположение к эндемическим областям и другие лабораторные результаты.

Известно много видов лептоспир. Много видов являются географически доминантными в некоторых регионах, а в других нет. *Viflexa paros 1* известна как перекрестно реактивная со многими серовидами, **но обычно не перекрестно реактивная со штаммами животных**. Относительная сила реакций может варьировать в зависимости от антигена. Это нужно принимать во внимание во время интерпретации. Для подтверждения рекомендуется использование культуры или MAT (среднее время вхождения в связь) анализа, так как эти анализы являются специфическими к серовиду.

Поскольку метод серологического анализа может давать разные результаты для слабо реактивных образцов, рекомендуется использовать другой серологический метод (напр., альтернативный метод, который отдельно определяет IgM и IgG антитело).

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Число антител положительных субъектов в популяции зависит от двух факторов: преобладания заболевания и клинических критериев, которые используются для тестирования популяции. Поскольку, только некоторые положительные результаты должны наблюдаться при случайном скрининге популяции на эндемической территории, большинство серологических тестов является неспецифическим даже при скрининге эндемической популяции. Даже в эндемической территории, серологический скрининг часто дает ошибочно положительные результаты, если используется для случайного скрининга пациента. Серологические тесты полезны для тестирования пациентов на эндемической территории с признаками и симптомами, совместимыми с заболеванием.

Уровни антител обычно низкие или отсутствуют во время ранней инфекции. Симптоматические пациенты могут не иметь антитела во время 1-2 недели после проявления, и титр антитела увеличивается со временем.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

		Референтный метод*	
		+	-
ДАИ	+	14	6
ДАИ	-	2	47

Положительное совпадение: 87,5 % (14/16)

Отрицательное совпадение: 88,7% (47/53)

*Референтный метод относится к коммерчески доступному ИФА.



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

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»