

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA В ОБРАЗЦАХ СТУЛА

8310-3, Crypto/Giardia Ag Combo ELISA

Каталог. № : 8310-3

Методика от 31-07-2013

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	Crypto / Giardia Ag Combo ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	ИФА типа "сэндвич"; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный и cut-off
Образец	стул
Специфичность	100 %
Чувствительность	99 %
Общее время	~ 100 мин.
Срок годности	12 мес. с даты изготовления

**Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание.*

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для качественного определения антигенов *Giardia* и *Cryptosporidium* в фекалиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

(См. оригинал инструкции на англ. языке).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Во время первой инкубации, антигены *Giardia* и/или *Cryptosporidium*, присутствующие в образце стула, захватываются антителами, привязанными к микролункам. Лунки инкубировали и промывали перед добавлением антител к *Giardia* и *Cryptosporidium*, конъюгированных с пероксидазой. Ферментный конъюгат будет «наслаивать» любой антиген, связанный с лунками. После промывок для удаления несвязанного ферментов добавляется хромоген, который развивает синий цвет в присутствии ферментного комплекса. Стоп-раствор останавливает реакцию и превращает синий цвет на желтый. Если антиген не захвачен, или недостаточный уровень антигена, не произойдет никакой цветной реакции.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Материалы, поставляемые с набором

1. **Стрипы микропланшета:** лунки с антителами к *Giardia* и *Cryptosporidium* – 96 лунок в держателе.
2. **Ферментный конъюгат:** 1 бут., содержащая 11 мл меченных пероксидазой антител к *Giardia* и *Cryptosporidium* с тимеросалом.
3. **Положительный контроль *Giardia*:** 1 флакон, содержащий 2 мл положительного к *Giardia* формализованного супернатанта стула.
4. **Положительный контроль *Cryptosporidium*:** 1 флакон, содержащий 2 мл положительного к *Cryptosporidium* формализованного супернатанта стула.
5. **Отрицательный контроль:** 1 флакон, содержащий 2 мл отрицательного к *Giardia/Cryptosporidium* формализованного супернатанта стула.
6. **Хромоген:** 1 бут., содержащая 11 мл хромогена ТМБ и перекиси водорода.
7. **Буфер для разбавления:** 4 бут., содержащие 30 мл буферизованного раствора белка с тимеросалом.
8. **Промывочный концентрат (20x):** 2 бут., содержащие 25 мл концентрированного буфера с ПАВ и тимеросалом.
9. **Стоп раствор:** 1 бут., содержащая 11 мл 5% раствора фосфорной кислоты.

ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для использования в диагностике In Vitro.

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

Исключение: Промывочный концентрат может выпадать в осадок во время хранения в холодильнике, но растворяется после нагревания.

Не добавлять в образцы или любые реагенты азиды.

Контроли и некоторые реагенты содержат тимеросал в качестве консерванта.

Обращайтесь со всеми образцами как с потенциально инфекционными материалами. Предотвращайте образование, аэрозолей и обеззараживайте любые брызги образцов.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках:

Хранить при 2-8°C.

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 СТУЛА (ФЕКАЛИЙ)

Никакой особенной техники забора образцов, которая бы отличалась от технологии, что используется при стандартном микроскопическом изучении, не требуется. Образцы стула могут использоваться как не законсервированные или замороженные в транспортировочной среде, так и в среде консерванта 10% формалина. Не законсервированные образцы следует хранить при 2-8°C и тестировать в течение 24 часов после забора. Если образец не может использоваться в течение этого времени, он должен быть заморожен до -20°C или ниже. Избегать повторного замораживания-размораживания. Формализованные образцы могут храниться при комнатной температуре (15-25°C) и исследоваться в течение 18 месяцев после забора. НЕ ЗАМОРАЖИВАЙТЕ такие образцы. Образцы, законсервированные в транспортировочной среде, хранить при 2-8°C или при -20°C и тестировать в течение 1 недели после забора.

Процедурные замечания

1. Все инкубации необходимо проводить при комнатной температуре 15-25°C.
2. Убедитесь, что все образцы и реагенты достигли комнатной температуры (15-25°C) перед использованием. Замороженные образцы должны быть полностью разморожены перед использованием.
3. Все разбавления стула должны быть сделаны буфером для разведения в наборе. Не используйте буфер для разведения из набора с другим номером партии.
4. При необходимости подготовленные образцы могут быть центрифугированы при 2000-3000 g в течение 5-10 минут. Убедитесь, что супернатант прозрачный перед использованием.
5. Избегать образования воздушных пузырей во время проведения анализа. Пузырьки могут повлиять на процедуру и считывание результатов теста. Постукивание перевернутыми лунками об чистую впитывающую бумагу после каждого шага промывки должно помочь минимизировать образование воздушных пузырьков в лунках.
6. Использовать контроли при каждом проведении анализа. Контроли поставляются предварительно разбавленными. НЕ ТРЕБУЮТ РАЗБАВЛЕНИЯ.
7. Незаконсервированные и консервированные образцы имеют различные процедуры исследования. См. ниже конкретные инструкции о том, как проводить анализ с использованием каждой процедуры.

ПРОЦЕДУРА

Поставляемые материалы

Микролуночный ИФА-набор для определения антигена *Giardia/Cryptosporidium* в стуле.

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок(с тонким наконечником).
- Реагентная (дист.) вода.
- Мерный цилиндр.
- Микродозатор.
- Аппликаторные палочки (рекомендуются) или тампоны для подготовки образцов.
- Пробирки для разведения образцов.

Рекомендуемое оборудование

Считывающее устройство для биохроматического чтения при длине волны 450/620-650 нм.

Рекомендуемая температура

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

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Процедура законсервированного образца

1. Для образцов в SAF, 10% формалине или Cary-Blair, тщательно перемешать содержимое в контейнерах. Дальнейшие действия не требуются.
2. Поместите необходимое количество лунок в держатель (число образцов плюс два контроля).
3. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунку №1 и 100 мкл положительного контроля в лунку №2.
4. Используя микропипетку, добавьте 50 мкл буфера разбавителя в каждую лунку образца. **НЕ ДОБАВЛЯЙТЕ буфер разбавителя в контрольные лунки.**
5. Добавьте 50 мкл образца в каждую лунку с буфером разбавителя.
6. Инкубируйте **60 мин.** при комнатной температуре (15-25°C), затем промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера.
7. Добавьте **2 капли** ферментного конъюгата в каждую лунку.
8. Инкубируйте **30 мин.** при комнатной температуре (15-25°C), потом промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера.
9. Добавьте **2 капли** хромогена в каждую лунку.
10. Инкубируйте **10 мин.** при комнатной температуре (15-25°C).
11. Добавьте **2 капли** стоп-раствора в каждую лунку. Смешайте хорошо постукиванием по внешней стенке держателя стрипов указательным пальцем на протяжении 15 секунд. Считайте результаты в течение **5 минут** после добавления стоп-раствора.
12. Считайте результаты визуально или с помощью планшетного ИФА-ридера (см. инструкции ниже).

Процедура незаконсервированного образца

1. Приготовьте разведения образцов в пробирках, используя **0.7 мл** Буфера для разведений и **0.1 г**, размер маленькой горошины, образца стула, используя аппликаторную палочку. Тщательно перемешать перед использованием.
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТАМПОНА, добавить **1 мл** буфера для разведений в пробирку для разведения. Покрывать тампон тонким слоем образца и выжать в буфере для разбавления, выдавливая как можно больше жидкости. Тщательно перемешать перед использованием.
2. Для жидких, незаконсервированных образцов, смешать содержимое и добавить **0.1 мл** образца к **0.7 мл** буфера для разведения в пробирку. Тщательно перемешать перед использованием.
3. Поместите необходимое количество лунок в держатель (число образцов плюс два контроля).
4. Используя микропипетку, добавьте **100 мкл** отрицательного контроля в лунку №1.
5. Используя микропипетку, добавьте **100 мкл** положительного контроля в лунку №2.
6. Добавить **100 мкл** образца в каждую лунку.
7. Инкубируйте **60 мин.** при комнатной температуре (15-25°C), затем промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера.
8. Добавьте **2 капли** ферментного конъюгата в каждую лунку.
9. Инкубируйте **30 мин.** при комнатной температуре (15-25°C), потом промойте.* После последней промывки вытряхните содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остаток промывочного буфера.
10. Добавьте **2 капли** хромогена в каждую лунку.
11. Инкубируйте **10 мин.** при комнатной температуре (15-25°C).

12. Добавьте **2 капли** стоп-раствора в каждую лунку. Смешайте хорошо постукиванием по внешней стенке держателя стрипов указательным пальцем на протяжении **15 сек.** Считайте результаты в течение **5 мин.** после добавления стоп раствора.
13. Считайте результаты визуально или при 450/620-650 нм.

***Промывка состоит из энергичного наполнения каждой лунки до краев и декантирования содержимого пять (5) раз. При возможности, избегайте образования воздушных пузырей в лунках, так как это может повлиять на конечные результаты.**

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интерпретация результатов – визуальная

- **Положительный:** Лунка образца, цвет которой наглядно более желтый, чем цвет лунки с отрицательным контролем.
- **Отрицательный:** Лунка образца, цвет которой наглядно менее желтый, чем цвет лунки отрицательного контроля.

Примечание: Отрицательный контроль, как и некоторые образцы, может давать легкий окрас. Лунки с образцами должны быть наглядно темнее, чем лунка отрицательного контроля, что б интерпретировать результат как положительный.

Интерпретация результатов – ИФА-ридер

Обнулите считыватель вхолостую. Считайте все лунки при **450/620-650 нм.**

- **Положительный:** абсорбция считывания 0,08 единиц ОП и выше указывает, что образец содержит антиген гардии.
- **Отрицательный:** абсорбция считывания менее 0,08 единиц ОП и выше указывает, что образец не содержит определяемых уровней антигена гардии.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Результаты исследования должны использоваться в целях диагноза и не должны интерпретироваться как диагностика сама по себе.
- НЕ КОНЦЕНТРИРУЙТЕ образцы стула. Анализ при этом может не показать точных результатов.
- Отрицательный результат может быть при уровне антигена ниже, чем определяемые границы этого анализа.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Образцы нормальных здоровых особ не должны содержать *Giardia* и *Cryptosporidium* и должны исследоваться как отрицательные. Положительная реакция указывает, что у пациента был выброс определяемого количества каждого антигена.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Анализ проводился при помощи данного анализа с использованием 135 свежих/замороженных образцов, подтвержденных микроскопически как положительные или отрицательные к *Giardia/Cryptosporidium* и 123 образца были определены как отрицательные к к обоим *Giardia* и *Cryptosporidium*. Результаты приведены в таблице.

Исследование №1

Референтный метод*	Микроскопическое исследование	ДАИ	
		+	-
	+	12	3
	-	0	120

Положительное совпадение: 100 % (12/12)

Отрицательное совпадение: 97,6% (120/123)

Исследование №2

Референтный метод*	<i>Giardia</i>	ДАИ	
		+	-
	+	35	0
	-	0	95

Положительное совпадение: 100 % (35/35)

Отрицательное совпадение: 100% (95/95)

Референтный метод*	<i>Cryptosporidium</i>	ДАИ	
		+	-
	+	52	0
	-	0	95

Положительное совпадение: 100 % (52/52)

Отрицательное совпадение: 99% (95/96)

Референтный метод*	<i>Cryptosporidium/ Giardia</i>	ДАИ	
		+	-
+		11	0
-		1	95

Положительное совпадение: 100 % (11/11)

Отрицательное совпадение: 99% (95/96)

*Референтный метод относится к коммерчески доступному ИФА.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Положительный и отрицательный контроли должны проводиться при каждом тестировании. Использование положительного и отрицательного контроля дает возможность простой оценки пригодности набора.

- Отрицательный контроль должен быть бесцветным при визуальном считывании и должен быть менее 0,08 ОП при считывании двойной длиной волны 450/620-650 нм.
- Каждый из положительных контролей должен быть отчетливого желтого цвета и считываться при более чем 0,5 ОП при двух длинах волн от 450/620-650 нм.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

- В пределах анализа (лунка в лунку) КВ был рассчитан с использованием 3 положительный *Cryptosporidium*, 3 положительных *Giardia* и 4 отрицательных образцов *Giardia/Cryptosporidium*. Образцы анализировались 10 раз в одной процедуре. Средний КВ для всех образцов составил 11,8%.
- Между анализами (от процедуры к процедуре) КВ был рассчитан с использованием 3 положительный *Cryptosporidium*, 3 положительных *Giardia* и 4 отрицательных образцов *Giardia/Cryptosporidium*. Образцы анализировались в 3 отдельных дня. Средний КВ для всех образцов составил 7,5%.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

(См. перечень в оригинале инструкции).



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