

НАБОР ИФА

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG K ENTAMOEBA HISTOLYTICA

EIA-3474, Entamoeba histolytica IgG ELISA

Кат. № : EIA-3474 Методика от 12-06-2014
Количество : 96 Версия 8.0
Производитель: DRG (Германия)



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

Назначение использования

Набор для качественного скрининга сыворотки на предмет наличия IgG антител к *Entamoeba histolytica*, используя иммуноферментный метод анализа.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Амебиоз – это заболевание, вызываемое простейшим паразитом *Entamoeba histolytica* (Амеба дизентерийная). Этот организм встречается повсеместно, особенно в развивающихся странах, и может быть обнаружен у иммигрантов или туристов из этих стран. Заболевание проявляется с кишечными симптомами. Реже организм выходит за пределы кишечника и вызывает, таким образом, абсцедирование различных органов. Среди поражаемых органов самым типичным является печень. Обычно, если организм попадает за пределы кишечника, в кале его дальнейшее обнаружение не возможно. Серологические тесты полезны при определении инфекций, вызванных Амебой, в том случае, если организм вышел за пределы кишечника, а также для исключения организма из диагностики других заболеваний (напр., хронические заболевания печени, язвенный колит, и т.д.). Серологический тест не предназначен для определения кишечной инфекции. Для определения этой инфекции рекомендуется использовать тесты для определения антигена *Entamoeba histolytica* в фекалиях.

Так как антитела могут присутствовать в течение многих лет после излечения, положительный результат анализа совсем не обязательно означает наличия активного инфекционного процесса. Отрицательный результат, однако, может быть очень важным для исключения подозрений на поражение тканей Амебой.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Микротитровальные лунки покрыты антигеном *Entamoeba histolytica*. 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 (тетрамилбензидин 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 штамма NIH-200 *Entamoeba histolytica* – 96 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 сыворотки.
- Отрицательный контроль сыворотки: один флакон, содержащий 1 мл разведенной отрицательной сыворотки.
- Хромоген: один флакон, содержащий 11 мл хромогена тетрамилбензидина (ТМБ).
- Промывочный раствор (20X): один флакон, содержащий 25 мл концентрированного буфера и ПАВ.
- Буфер для разведения: два флакона, содержащий 30 мл буферного раствора протеина.

- Стоп раствор: один флакон, содержащий 11 мл 0.73 М фосфорной кислоты.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ:

1. Не рекомендуется использовать мутные растворы или же, если в них содержится осадок. Промывочный концентрат может кристаллизоваться при хранении при температуре 2-8° С. Кристаллизация исчезнет после раствора концентрата для работы с ним.
2. Не рекомендуется использовать сыворотку, побуждающую рост микробов или же мутную из-за высокого содержания липидов. Перед использованием образцы с высоким содержанием липидов необходимо очистить.
3. С серой 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.
4. 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.
- Гибкий флакон, содержащий разведенный промывочный буфер, можно хранить при комнатной температуре.

ПОДГОТОВКА

Промывочный буфер – Добавить содержимое флакона в 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 серу. Хранить сыворотку при 2-8 °С, если она будет анализироваться в течение нескольких дней. Заморозить образец до -20° С или ниже, в случае, если образец не используется сразу (при хранении от 3 до 6 месяцев).

Не нагревать инактивированную сыворотку и избегать повторного замораживания образцов.

Тестируемые 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 *E. histolytica* IgG ELISA.

Необходимые материалы, не поставляемые в наборе

Пипетки
Гибкий флакон для промывки стрипов (рекомендуется с узким горлышком)
Вода, содержащая реагенты и мерный цилиндр
Пробирки для разведения образцов
Абсорбирующая бумага
Таймер

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) тест 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. Извлечь из планшета остатки влажности с помощью бумажного полотенца.
8. Добавить 2 капли (100 мкл) хромогена в каждую лунку.
9. Инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут.
10. Добавить 2 капли (100 мкл) стоп раствора и тщательно смешать.



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

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Наглядно: Посмотрите на каждую лунку на белом фоне (напр. бумажное полотенце) и запишите четко или +, ++ или же +++ реакция.

ELISA Ридер: Нулевой ридер. Установите для двухцветных 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 давать 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 0.4 ОП единиц.

Отрицательное - считывание оптической плотности менее чем 0.4 ОП единиц.

- Положительное считывание ОП указывает на то, что пациент может быть инфицирован *E. histolytica*
- 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.

ДААННЫЕ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Исследование №1: Канадский Центр Стандартизации
Проведено сравнение набора ДРГ и другого набора ИФА. Получена согласованность в 96,3% (n = 82)

Исследование №2: Центр по Контролю за Болезнями и Профилактике (CDC&P):

Чувствительность 92% (22/24)

Специфичность 100% (21/21)