

НАБОР ИФА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ В ОБРАЗЦАХ СТУЛА АНТИГЕНА GIARDIA LAMBLIA

EIA-3477, Giardia Lamblia Ag (stool)

Каталог. № : EIA-3477
Количество : 96
Производитель: DRG (Германия)

Методика от 08-2013
Версия 4.0



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

1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Для использования в ИФА in-Vitro для качественного определения антигена Giardia в фекальном образце.

2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ

Giardia lamblia – это простейший паразит, вызывающий жиаурдиоз (лямблиоз). Симптомами острого жиаурдиоза являются диарея, тошнота, потери в массе тела, мальабсорбция, спазмы, метеоризм, анемия. Заболевание может проявиться как в острой и хронической, так и в бессимптомной форме. Жиардиз – одно из самых распространённых паразитических заболеваний в США; он становится причиной около 100 млн. легких инфекций и 1 млн. тяжелых инфекций каждый год.

Путь передачи Giardia – фекально-оральный: цисты попадают в пищу. Эпидемии жиаурдиоза фиксируются в детских садах и во время питья зараженной воды. В детских садах прямо или косвенно фиксируется до 45% от всех случаев инфицирования Giardia в США. Однажды исследование показало, что у 54% детей в детском саду была инфекция.

Диагностика жиаурдиоза проводилась с помощью разных методик с оперативным вмешательством и без него. Среди нехирургических методов самым распространённым считалось исследование кала под микроскопом. Однако успешность этого метода сильно зависит от квалификации лиц, проводящих его, и тщательности обследования всего организма. По причине низкой эффективности микроскопического исследования и перебегающего выделения организмов стали разрабатываться другие методы диагностики.

Одной из таких альтернатив стал метод захвата антигена с помощью энзим-связывающего иммуносорбентного анализа (ELISA) для применения с испражнениями. Эти методы сравнимы по чувствительности с достаточно опробованным микроскопическим анализом. Они достаточно просты в проведении и не требуют при этом обследования всего организма.

3. ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Во время первой инкубации антигена Giardia, находящиеся в каловых массах, захватываются антителами, расположенных в лунках. Во время второй инкубации добавляются дополнительные антитела к Giardia, которые образуют «сэндвич» с антигеном, зажимая его между собой с двух сторон. Следующая инкубация позволяет удалить не прореагировавшие дополнительные антигены с помощью добавления конъюгата анти-антител и пероксидазы. После промывки для удаления несвязавшихся ферментов, добавляется хромоген, который в присутствии ферментативного комплекса и пероксида дает синее окрашивание. Стоп-раствор останавливает реакцию и меняет окрашивание с синего на жёлтое.

4. РАГЕНТЫ

- Тест-стрипы: микролуночки с поликлональными антителами к Giardia – 96 лунок в держателе тест-стрипа.
- Ферментный конъюгат: 1 бутылка с 11 мл меченных пероксидазой антител анти-Giardia с тимеросалом.
- Положительный контроль: 1 флакон с 2 мл разведенных в формалине каловых масс с Giardia.
- Отрицательный контроль: 1 флакон, содержащий 2 мл разведенного буфера.
- Хромоген: 1 бутылка с 11 мл ТМБ (тетраметилбензидина) и пероксида.
- Промывочный концентрат 20X: 2 бутылки с 25 мл концентрированного буфера с детергентом и тимеросалом.
- Разбавляющий буфер: 4 бутылки с 30 мл буферизованного протеинового раствора с тимеросалом.

- Стоп-раствор: 1 флакон с 11 мл 0.5% фосфорной кислоты.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для использования в in-Vitro диагностике.
- Не использовать реагенты, если в них наблюдается осадок или помутнения. **Исключение:** Промывочный концентрат может дать осадок во время при низкой температуре, но осадок растворится размораживанием.
- Не заменять в наборах реагенты с различными номерами партий.
- Не использовать простроченные реагенты. Сроки годности указаны на этикетках реагентов.
- Неиспользованные микролуночки должны храниться с в мешочке с осушителем, чтобы защитить их от влаги.
- Не давливать аэриды к образцам или любым реагентам.
- Контроли и некоторые реагенты содержат Тимеросал в качестве консерванта.
- Обращаться со всеми реагентами и образцами как с потенциально заразным материалом. Использовать аккуратно, чтобы предотвратить разбрызгивание и контаминацию образцов.
- Стоп-раствор – это 5% водный раствор фосфорной кислоты. При попадании на кожу обильно промыть водой. При попадании в глаза обильно промыть их водой и обратиться к врачу.
- Использование ПАВ противопоказано в этом наборе ELISA.
- Люди, страдающие дальтонизмом или расстройствами зрительного аппарата, не способные увидеть результатов анализа, должны использовать спектрофотометрический метод для получения результатов.

6. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, стрипы и компоненты во флаконах:

- Хранятся при 2 – 8 °С.
- Гибкий флакон с разведенным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

7. ПОДГОТОВКА

- Перед использованием приведите все реагенты и образцы к комнатной температуре (15 – 25°C) и перемешайте.
- **Промывочный концентрат (20x)** может оставлять осадок во время хранения в охлажденном виде, но который растворяется при его доведении до комнатной температуры (15–25°C) и перемешивании. **Убедитесь, что промывочный концентрат (20x) полностью растворен перед его разведением до рабочей концентрации.** Снять крышку и добавить содержимое промывочного концентрата в гибкий флакон с 475 мл дистиллированной воды. Покрутить флакон в руках для перемешивания. Гибкий флакон должен быть с узким горлышком, чтобы оптимизировать промывание.

8. СБОР СТУЛА (ФЕКАЛИЙ)

Не требуется изменения стандартной методики сбора для микроскопического исследования. Образцы стула могут быть использованы как в замороженном не законсервированном виде, так и в промежуточном законсервированном состоянии в 10% формалине.

Незаконсервированные образцы должны храниться при 2 – 8°C и быть использованными в течение 24 ч после сбора. Образцы, которые не удалось использовать за это время, необходимо заморозить при -20°C или ниже до следующего использования. Заморозка не оказывает негативного влияния на анализ.

Образцы, законсервированные в формалине и ПАВ, могут храниться при комнатной температуре (15-25 °C) или 2-8°C, и использоваться для анализа в течение 18 месяцев со дня сбора. НЕ ЗАМОРАЖИВАТЬ консервированные образцы.

Образцы в среде Кери-Блэра должны храниться при 2-8°C и исследоваться в течение 1 недели после сбора. Избегайте неоднократных циклов замораживания/размораживания.

9. ПРОЦЕДУРА

9.1 Поставляемый материал

Набор ИФА с лунками, содержащими стул с антигенами Giardia, реагенты, рамка для стрипов.

9.2 Необходимый, но не поставляемый материал

- Пипетки для переноса проб.
- Гибкий флакон для промывания лунок (желательно с узким горлышком).
- Мерная колба.
- Дистиллированная вода.

- Микропипетка.
- Палочки (рекомендуются) или мазки для подготовки образца.
- Пробирки для разведения образца.

9.3 Считывающее оборудование

ИФА планшет-ридер со светофильтрами на 450 и 620 – 650 нм.

9.4 Процедура анализа

9.4.1 Примечания

- Перед использованием удостовериться, что все образцы и реагенты достигли комнатной температуры (15-25 °С). Замороженные образцы должны быть полностью разморожены перед использованием.
- При необходимости, подготовленные образцы могут центрифугироваться при 2000-3000 г в течение 5-10 мин. Перед использованием удостовериться, что супернатант чистый.
- При проведении анализа следует избегать образования пузырьков в лунках.
- Пузырьки могут повлиять на всю процедуру и считывание результатов в конце. Постукивание лунками о чистое промокательное полотенце после каждого этапа процедуры должно устранить пузырьки в лунках.
- **Образцы могут исследоваться, следуя процедуре разведения в лунке или пробирке. Точные указания по применению этих процедур см. ниже.**

9.4.2 Процедура анализа законсервированных образцов

1. Для образцов в SAF, 10% растворе формалина или Кери-Блэра тщательно перемешать содержимое внутри емкости. Дальнейшей обработки не требуется.
2. Отломить требуемое количество лунок (количество образцов + 2 контроля) и поместить их в рамку.
3. Используя микропипетку, добавить **100 мкл** отрицательного контроля в лунку №1 и **100 мкл** положительного контроля в лунку №2.
4. Используя микропипетку, добавить по **50 мкл** разбавляющего буфера в каждую лунку с образцом. **НЕ ДОБАВЛЯТЬ разбавляющий буфер в лунки контролей.**
5. Добавить по **50 мкл** образца в каждую лунку для образца с разбавляющим буфером.
6. Инкубировать **60 минут** при комнатной температуре (15-25 °С), затем промыть. По окончании последней промывки постучать лунками о чистое промокательное полотенце, чтобы удалить излишек промывочного буфера.
7. Добавить в каждую лунку по **2 капли** Ферментного Конъюгата.
8. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (15-25°С), затем промыть.* По окончании последней промывки постучать лунками о чистое промокательное полотенце, чтобы удалить излишек промывочного буфера.
9. Добавить по **2 капли** Хромогена в каждую лунку.
10. Инкубировать **10 минут** при комнатной температуре (15-25°С).
11. Добавить **2 капли** Стоп-раствора в каждую лунку. Перемешать содержимое лунок, аккуратно постукивая в течении **15 секунд** указательным пальцем по рамке для стрипов. Считать реакцию в течении **5 минут** после добавления стоп-раствора.
12. Считать результаты визуально или на планшет-ридере (См. инструкции ниже).

9.4.3 Процедура анализа незаконсервированных образцов

1. Произвести разведения образца в пробирках, используя **0.7 мл** Буфера для разбавления и **0.1 г**, размером с горошину, фекального образца с помощью палочки. Перед использованием тщательно перемешать. **ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МАЗКОВ**, добавить **1 мл** разбавляющего буфера в соответствующую пробирку. Покрывать мазок тонким слоем образца и размешать в разбавляющем буфере, выдавливая как можно больше жидкости. Перед использованием тщательно перемешать.
2. Для образцов, не содержащих воды в качестве консерванта, смешать содержимое, затем добавить **0.1 мл** образца к **0.7 мл** разбавляющего буфера в пробирки для разбавления. Перед использованием тщательно перемешать.
3. Отломить требуемое количество лунок (количество образцов + 2 контроля) и поместить их в рамку.
4. Используя микропипетку, добавить **100 мкл** отрицательного контроля в лунку №1.
5. Используя микропипетку, добавить **100 мкл** положительного контроля в лунку №2.
6. Добавить по **100 мкл** разбавленного образца в каждую лунку.
7. Инкубировать **60 минут** при комнатной температуре (15-25°С), затем промыть.* По окончании последней промывки постучать

лунками о чистое промокательное полотенце, чтобы удалить излишек промывочного буфера.

8. Добавить в каждую лунку по **2 капли** Ферментного Конъюгата.
9. Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (15-25°С), затем промыть.* По окончании последней промывки постучать лунками о чистое промокательное полотенце, чтобы удалить излишек промывочного буфера.
10. Добавить по **2 капли** Хромогена в каждую лунку.
11. Инкубировать **10 минут** при комнатной температуре (15-25°С).
12. Добавить **2 капли** Стоп-раствора в каждую лунку. Перемешать содержимое лунок, аккуратно постукивая в течении **15 секунд** указательным пальцем по рамке для стрипов. Считать реакцию в течении **5 минут** после добавления стоп-раствора.
13. Считать результаты визуально или на планшет-ридере (См. инструкции ниже).

* **Промывки состоят из усиленного 5-кратного заполнения, переливания и декантации каждой лунки. Избежать образования пузырьков в лунках, поскольку это может повлиять на конечные результаты.**

10. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование положительного и отрицательного контролей позволяет легко удостоверяться в стабильности набора.

- **Отрицательный контроль** должен выглядеть бесцветным при визуальном считывании и показателе оптической плотности менее 0.08 ОП и считывании при двойной длине волны 450/620-650 нм.
- **Положительный контроль** должен быть отчетливого желтого цвета при визуальном считывании и показателе оптической плотности менее 0.5 ОП и считывании при двойной длине волны 450/620-650 нм.

11. РЕЗУЛЬТАТЫ

11.1 Интерпретация результатов – визуально

Положительный: Любая лунка с образцом, которая явно более желтая, чем лунка отрицательного контроля.

Отрицательный: Любая лунка с образцом, которая явно не более желтая, чем лунка отрицательного контроля.

ВАЖНО: как отрицательный контроль, так и некоторые образцы могут давать слабое окрашивание. Лунки с образцами должны быть явно темнее, чем лунки с отрицательным контролем для достижения положительного результата. Используйте прилагаемую в комплекте таблицу окрашивания для соотношения результатов.

11.2 Интерпретация результатов – ридер ИФА

Выставить ридер на ноль. Считать все лунки при 450/620 – 650 нм.

Реактивный: поглощение от 0.08 ОП и выше указывает на присутствие антигена Giardia.

Нереактивный: поглощение менее 0.08 ОП указывает на отсутствие обнаруживаемых уровней антигенов Giardia в образце.

12. ОГРАНИЧЕНИЕ ПРОЦЕДУРЫ

- Результаты анализа могут быть использованы как вспомогательные при диагностике, но ни в коем случае как основание для постановки диагноза.
- НЕ концентрируйте образцы стула. Анализ не даст точных результатов с концентрированным образцом.
- Может получиться отрицательный результат, если количество антигена ниже уровня чувствительности анализа. Для пациентов с подозрением на жидриаз можно проводить несколько анализов через определённый промежуток времени.

13. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

У здоровых людей в норме Giardia не должна быть и анализ должен давать отрицательный результат. Положительный результат показывает, что пациент выделяет определенное количество антигена к Giardia. У некоторых групп людей, таких как гомосексуалисты или дети в детском саду, высокие показатели инфицирования Giardia, в отличие от обычного населения. Ознакомьтесь с разделом статистики для сравнений.

14. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Исследования

(См. в оригинале инструкции).

Воспроизводимость

КВ в анализе (межлуночный) был рассчитан с помощью 4 положительных и 4 отрицательных образцов, проанализированных 24 раза в одном исследовании. Средний КВ составил 3.67% с наивысшим показателем 6.18%.

КВ между анализами (межпроцедурный) был рассчитан с помощью 4 положительных и 4 отрицательных образцов, проанализированных

в трех отдельных днях. Средний КВ составил 4.08% с наивысшим показателем 11.61%.

Перекрестная реактивность

Не было замечено перекрестных реакций со следующими организмами:

Entamoeba hartmanni, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Chilomastix mesnili*, *Strongyloides stercoralis*, *Cryptosporidium*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, виды *Diphyllobothrium*, *Hymenolepis nana*, *Clonorchis sinensis*, *Enteromonas hominis*, *Trichuris trichiura*, *Iodamoeba buetschlii*, анкилостома, *Schistosoma mansoni*, ротавирус, яйца *Taenia*, яйца *Fasciola*, *Isospora belli*, *Entamoeba polecki*, аденовирус, и 33 вида бактерий (полный список может быть предоставлен по требованию).

ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема: отрицательный контроль приобретает сильное окрашивание.

Причина: недостаточность промывок

Решение: промыть более тщательно. Удалить излишек жидкости из лунок постукивая о промокательное полотенце. Не позволять высохнуть исследуемым лункам.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

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