



осторожность, чтобы не допустить образование аэрозолей и обеззараживайте любое разливание образцов.

Набор ИФА для определения токсина A+B C.difficile

Кат. номер : 8308-3
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 22-10-2009

Внимание: основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Анализ	C.difficile Toxin A+B 2d Generation ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения образцов	Качественный - положительный; отрицательный контроль 1 г образца стула
Специфичность	100 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 70 мин.
Срок годности	11 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Данный набор предназначен для качественного определения in vitro C.difficile toxin A+B в фекалиях.

ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

Во время первой инкубации токсина C.difficile A+B, присутствующие в супернатанте стула, захватываются антителами, привитым к лункам. Вторая инкубация добавляет дополнительное анти-toxin A+B антитело, что приводит к тому, что антиген оказывается в сэндвиче. Следующая инкубация добавляет анти-второе антитело конъюгированное с пероксидазой. После вымывания для удаления несвязанного фермента, добавляется хромоген, который в присутствии ферментного комплекса и перекиси развивает голубой цвет. Стоп раствор останавливает реакцию и превращает голубой цвет на желтый.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- **Стрипы микропланшета:** лунки с поликлональными антителами анти-C.difficile toxin A+B – 96 лунок в рамке для исследуемых стрипов.
- **Ферментный конъюгат:** 1 бут., содержащая 6 мл антител к C.difficile, конъюгированных пероксидазой с тимеросалом.
- **Положительный контроль:** 2 флакона, содержащие 2 мл каждый или токсин А или токсин В в буфере белка с тимеросалом.
- **Отрицательный контроль:** 1 флакон, содержащий 2 мл буфера для разбавления.
- **Хромоген:** 1 бут., содержащая 11 мл хромогена ТМБ и перекиси.
- **Буфер для разбавления:** 2 бут., содержащие 30 мл белкового раствора буфера.
- **Промывочный концентрат 20x:** 1 бут., содержащие 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества с тимеросалом.
- **Стоп-раствор:** 1 бут., содержащая 11 мл 1М фосфорной кислоты.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Не используйте растворы, если они содержат осад или становятся мутными.
(Исключение: в моющем концентрате может быть осад при хранении в холодильнике, но он растворяется при нагревании).
- Не добавляйте азиды в реагенты или образцы.
- Контроли и некоторые реагенты содержат тимеросал в качестве консерванта.
- Обращайтесь со всеми реагентами и образцами как с потенциально инфекционными материалами. Соблюдайте

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, стрипы и содержимое бутылок: храните при 2-8°C. Бутылка, содержащая разбавленный промывочный буфер может храниться при комнатной температуре.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

- Перед использованием довести все реагенты и образцы до комнатной температуры (15-25°C) и перемешать.
- (20x) Промывочный концентрат может образовать осадок в течение хранения в холодном месте, но будет приведен в состояние раствора при комнатной температуре (15-25°C) и перемешан. **Убедитесь, что (20x) промывочный концентрат полностью в состоянии раствора перед его разбавлением до рабочей концентрации.** Для разбавления (20x) промывочного концентрата до рабочего состояния удалите крышку и добавьте содержимое 1 бутылки промывочного концентрата в сдавливающую бутылку, содержащую 475 мл дистиллированной воды. Вращайте для смешивания. Сдавливающая бутылка должна иметь узкий наконечник для оптимального промывания.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Сбор стула (фекалий)

Никакой особенной техники забора образцов, которая бы отличалась от технологии, что используется при стандартных бактериологических исследованиях, не требуется. Необработанные консервантами образцы следует хранить при 2-8°C и анализировать в течении 24 часов после забора. Если образец не может использоваться в течении этого времени, он должен быть заморожен до -20°C или ниже. Избегать неоднократных циклов замораживания/размораживания. Консервированные образцы не исследовались в анализе.

ПРОЦЕДУРА

Поставляемые материалы

- Набор ИФА фекального антигена токсина C.difficile A+B.
- Держатель микрострипов.

Материалы необходимые, но не поставляемые

- Пипетки для переноса
- Сдавливающая бутылка для промывания стрипов (рекомендуется узкий наконечник)
- Мерная колба
- Градуированная дистиллированная вода
- Микродозатор
- Пробирки для разбавления образца
- Палочка аппликатор (рекомендуется) или мазок для подготовки образца.

Рекомендуемое оборудование

- Планшетный ИФА-ридер с фильтрами (DAX800) 450 и 620-650 нм.

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

Примечания:

- Перед использованием убедитесь, что все образцы и реагенты комнатной температуры (15-25°C). Замороженные образцы должны быть полностью разморожены перед использованием.
- При необходимости, подготовленные образцы могут быть центрифугированы при 2000-3000г в течение 5-10 минут. Перед использованием убедитесь, что супернатант чистый.
- При выполнении анализа пытайтесь избежать образования пузырьков в лунках. Пузыри могут повлиять на общую производительность и считывание конечных результатов. Удаление содержимого лунок на фильтровальное полотенце после каждого шага промывки должно помочь свести к минимуму наличие пузырьков в лунках.
- **Все разведения образцов стула должны быть сделаны поставляемым буфером для разведения. Не используйте буфер для разбавления из набора с различным номером серии.**

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Отломите необходимое количество лунок в рамке (определенное количество образцов плюс два контроля) и поместите в держателе.
2. Проведите разбавления образцов в пробирках, используя 0,3 мл буфера для разбавления и 0,1 г (размером с

горошину) образца стула, используя палочку аппликатора. Перед использованием тщательно перемешайте.

ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МАЗКОВ, в пробирку для разбавления добавить 0,6 мл буфера для разбавления. Нанести на мазок тонкий слой образца и перемешать в буфере для разбавления, образуя как можно больше жидкую массу. Тщательно перемешать перед использованием.

3. Для водянистых образцов, без консервантов перемешать содержимое, затем добавить 0,1 мл образца к 0,3 мл буфера для разбавления в пробирку для разбавления. Тщательно перемешать перед использованием.
4. Добавьте в каждую лунку по 1 капле (50 мкл) конъюгата (включая лунки контроля).
5. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунку №1.
6. Используя микропипетку, добавьте 100 мкл отрицательного контроля в лунку №2.
7. Добавьте в каждую лунку по 100 мкл разбавленного образца. Перемешайте содержимое лунок легким постукиванием указательным пальцем стенки рамки стрипов в течение 15 секунд.
8. Инкубируйте 60 мин. при комнатной температуре (15-25°C), потом промойте.* После конечной промывки вытряхнуть содержимое лунок на чистое промокательное полотенце, чтобы удалить остатки промывочного буфера.
9. Добавьте в каждую лунку по 2 капли хромогена.
10. Инкубируйте 10 мин. при комнатной температуре (15-25°C).
11. Добавьте в каждую лунку по 2 капли стоп раствора. Смешайте хорошо постукиванием по внешней стенке рамки стрипов указательным пальцем в течение 15 секунд. Считайте реакцию в течение 5 минут после добавления стоп-раствора.
12. Считайте результаты визуально или при использовании 450/620-650 нм. Обнулите считыватель вхолостую.

*Промывки состоят из энергичного наполнения каждой лунки до краев 5-кратной заполнением и декантацией содержимого. Если это возможно, избегайте образования пузырьков в лунках, поскольку это может повлиять на конечные результаты.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – ВИЗУАЛЬНАЯ

Реактивный: Любая лунка с образцом, цвет которой явно более желтый чем цвет лунки с отрицательным контролем.

Нереактивный: Любая лунка с образцом, цвет которой явно менее желтый, чем цвет лунки отрицательного контроля.

Примечание: отрицательный контроль, как и некоторые образцы, может демонстрировать некоторый слабый цвет. Лунка образца должна быть явно темнее чем лунка отрицательного контроля, чтобы принимать ее за положительный результат.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ – ИФА-РИДЕР

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

Реактивный: считывание абсорбции на уровне 0,1 единиц ОП и выше указывает на то, что образец содержит токсин(ы) C.difficile.

Нереактивный: если абсорбция ниже 0,1 единиц ОП, это указывает на то, что образцы не содержат определяемый уровень токсина(ов) C.difficile.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

- Результаты исследования должны использоваться в целях диагноза и не должны интерпретироваться как диагностические сами по себе.
- НЕ концентрируйте образцы стула. Анализ при этом может не показать точных результатов.
- Отрицательные результаты могут быть при уровне антигена ниже, чем определяемая граница этого анализа. Множественные образцы могут быть указательными для тех пациентов, которые подозреваются как положительные к C.difficile.

ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

- Положительная реакция указывает, что пациентом выбрасываются обнаруживаемые количества антигена C.difficile.
- Частота болезни C.difficile зависит от различных факторов, таких как: тип телосложения, совокупность пациентов и потенциальная вспышка. Уровень асимптоматических переносчиков болезни был зафиксирован в Швеции на уровне 2% и до 15% в Японии. Как показало одно исследование, госпитализированные пациенты, принимающие определенные антибиотики попали под высокий риск приобретения C.difficile с уровнем инфицированности 21%.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Примерные данные, полученные в ряде исследований относительно специфичности и воспроизводимости указаны в оригинале инструкции.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ

Не было обнаружено перекрестных реакций со следующими организмами:

Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Salmonella infantis, Proteus vulgaris, Campylobacter coli 1114, Campylobacter coli 1111, Campylobacter fetus, Campylobacter lari, Campylobacter jejuni, Campylobacter sputorum, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Serratia liquefaciens, Enterobacter cloacae, Citrobacter braakii, Shigella flexneri, Shigella sonnei, Shigella dysenteriae, Escherichia hermannii, Yersinia enterocolitica, Helicobacter pylori, E. coli 25992, E. coli 12014, E. coli 43887, E. coli 33780, E. coli 43890 and E. coli 43893.

ОБНАРУЖЕНИЕ И УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема: Отрицательный контроль имеет чрезмерно насыщенный цвет после развития.

Причина: неадекватные промывания.

Устранение: промывайте более тщательно. Удалите остаток жидкости из лунок, постукиванием на промокательную бумагу.

Не давайте возможности исследуемым лункам высохнуть.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции на стр. 8).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua