

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ASCARIS LUMBRICOIDES IgG ELISA

Ascaris Lumbricoides IgG ELISA

Каталог. №: EIA-3817

Дата випуску інструкції: 2021-01-07
Версія 12.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

1 ВСТУП

Аскариди - великі нематоди. Чоловічі особини досягають 25 см, жіночі - до 40 см.

Ascaris lumbricoides є одним з видів *Ascaridae*, що має найвище значення для медицини людини, тому що він єдиний з основним господарем людини.

Статевозріла аскарида живе в тонкому кишечнику. Самки щодня виробляють до 200 000 яєць, які потрапляють у навколишнє середовище з фекаліями. Інфекційні личинки розвиваються всередині яєць і після перорального прийому вилуплюються у верхній частині тонкої кишки. Вони проникають через стінку кишечника і потрапляють у венозну кров, з якою потрапляють у печінку та легені, де залишають судини та шкіру в авеолах. Личинки мігрують у трахею та через глотку після ковтання назад до тонкої кишки, де відбувається дозрівання дорослого хробака. Приблизно через 10-12 тижнів після зараження, аскариди виводяться з фекаліями. Дорослий черв'як живе близько 18 місяців.

Ascaris lumbricoides - один з найпоширеніших збудників інфекційних захворювань у всьому світі. Основними ендемічними районами є Східна Азія, Африка та Середня та Південна Америка. Діти хворіють частіше, ніж дорослі. Інвазія призводить до аскаридозу переважно з прихованим прогресуванням. Мігруючі личинки можуть призвести до запальної, еозинофільної інфільтрації легенів і викликати кашель, задишку та легку лихоманку. Конгломерати глистів можуть викликати закупорку кишечника. Якщо глисти мігрують в жовч, підшлункову залозу або шлунок, виникають відповідні клінічні симптоми.

Види	Захворювання	Симптоми (напр.)	Шлях передачі
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Аскаридоз	Дорослі хробаки взагалі не викликають симптомів. Конгломерати хробаків можуть викликати біль у животі та запор. Інфекція жовчного міхура, шлунку або підшлункової залози призводить до відповідних симптомів. Мігруючі личинки здатні викликати легеневі симптоми, такі як кашель та задишка.	Ковтання інфекційних яєць аскарид (класичний спосіб зараження - це споживання недостатньо промитого салату)

Інфекцію або присутність збудника можна визначити за допомогою:

- Мікроскопії: виявлення яєць у фекаліях
- Серології: виявлення антитіл методом ІФА

2 ПРИЗНАЧЕННЯ

Аналіз IgG *Ascaris lumbricoides* призначений для якісного визначення антитіл класу IgG проти *Ascaris lumbricoides* у сироватці або плазмі людини (цитрат, гепарин).

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Якісне імуноферментне визначення специфічних антитіл ґрунтується на методиці ІФА (імуноферментний аналіз).

Мікротитрові пластини покриті специфічними антигенами для зв'язування відповідних антитіл зразка. Після промивання лунок для видалення всього незв'язаного матеріалу зразка додають кон'югат помічений пероксидазою хрону (HRP). Цей кон'югат зв'язується з захопленими антитілами. На другому етапі промивання незв'язаний кон'югат видаляють.

Імунний комплекс, утворений зв'язаним кон'югатом, візуалізується,

шляхом додавання субстрату тетраметилбензидину (ТМБ), який дає синій продукт реакції.

Інтенсивність цього продукту пропорційна кількості специфічних антитіл у зразку. Сірчана кислота додається, щоб зупинити реакцію. Це дає жовтий колір кінцевої точки. Поглинання при 450/620 нм зчитується за допомогою зчитувача мікропланшетів ELISA.

4 МАТЕРІАЛИ

4.1 Реагенти, які постачаються

- **Мікротитровий планшет:**
12 роздільних 8-лункових відривних смужок, покритих антигенами *Ascaris lumbricoides*; в алюмінієвій фользі, що закривається.
- **Буфер для розведення зразків:**
1 флакон, що містить 100 мл фосфатного буферу (10мМ) для розведення зразків; рН 7.2 ± 0.2; жовтого кольору; готовий до використання; білий ковпачок; ≤0.0015% (v/v) СМІТ/МІТ (3:1). зеленого кольору;
- **Стоп-розчин:**
1 флакон, що містить 15 мл сірчаної кислоти, 0.2 моль/л; готовий до використання; червоний ковпачок.
- **Промивний розчин (20x конц.):**
1 флакон, що містить 50 мл 20-кратного концентрату фосфатного буферу (0.2 М), рН 7.2 ± 0.2, для промивання лунок; білий ковпачок.
- **Кон'югат:**
1 пляшка, що містить 20 мл пероксидази міченої Протеїном А у фосфатному буфері (10мМ); синього кольору, готовий до використання; чорний ковпачок.
- **Розчин ТМБ субстрату:**
1 флакон, що містить 15 мл 3,3',5,5'- тетраметилбензидину (ТМБ), <0.1%; готовий до використання; жовтий ковпачок.
- **Позитивний контроль:**
1 флакон, що містить 2 мл контролю; жовтого кольору; готовий до використання; червоний ковпачок; ≤0.02% (v/v) МІТ.
- **Cut-off контроль:**
1 флакон, що містить 3 мл контролю; жовтого кольору; готовий до використання; зелений ковпачок; ≤0.02% (v/v) МІТ.
- **Негативний контроль:**
1 флакон, що містить 2 мл контролю; жовтого кольору; готовий до використання; синій ковпачок; ≤0.0015% (v/v) СМІТ/МІТ (3:1).

Інформацію про небезпеку та запобіжні заходи див. 12.1

Щодо потенційно небезпечних речовин перевірте паспорт безпеки.

4.2 Матеріал, що постачається

- 1 плівка для накривання
- 1 інструкція з використання
- 1 схема планшету

4.3 Необхідні матеріали та обладнання

- Мікротитровий зчитувач планшетів ELISA, обладнаний для вимірювання поглинання при 450/620 нм.
- Інкубатор 37°C
- Ручне або автоматичне обладнання для промивання мікротитрових планшетів
- Піпетки об'ємом 10 та 100 мкл
- Вортексний трубчастий міксер
- Дистильована вода
- Одноразові пробірки

5 СТАБІЛЬНІСТЬ ТА ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати набір при температурі 2 °С– 8 °С.

Відкриті реагенти стабільні до закінчення терміну придатності, який вказаний на етикетці, якщо зберігати їх при температурі 2 °С - 8°C.

6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо перед початком тестування довести всі реагенти та зразки до кімнатної температури (20°C - 25°C) і добре їх перемішати.

6.1 Мікротитровий планшет

Відривні смужки покриті антигенами *Ascaris lumbricoides*. Відразу після видалення смужок решту смужок слід знову запечатати в алюмінієву фольгу разом із осушувачем та зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С.

6.2 Буфер для промивання (20x конц.)

Розведіть буфер для промивання 1 + 19; наприклад 10 мл промивного буферу + 190 мл дистильованої води.

Розведений буфер стійкий протягом 5 днів при кімнатній температурі (20 °С - 25 °С). У разі появи кристалів у концентраті розігрійте розчин до 37 °С, наприклад, на водяній бані. Перед розведенням добре перемішати.

6.3 Розчин ТМБ субстрату

Реагент готовий до використання і повинен зберігатися при температурі від 2 °С до 8 °С, подалі від світла. Розчин повинен бути безбарвним або мати легкий синій відтінок. Якщо субстрат стає синім, він, можливо, забруднився і його слід викинути.

7 ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

У цьому аналізі використовуйте зразки сироватки або плазми людини (цитрат, гепарин).

Якщо аналіз проводиться протягом 5 днів після забору зразків, проби слід зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С; в іншому випадку їх слід поділити на аликвоти і зберігати замороженими (від -70 °С до -20 °С). Якщо зразки зберігаються замороженими, перед тестуванням добре перемішайте розморожені зразки. Уникайте повторного заморожування та розморожування.

7.1 Розведення зразка

Перед тестуванням, усі разки слід розвести **1+100** Буфером для розведення зразків IgG.

Додайте 10 мкл зразка та 1 мл буферу для розведення зразків IgG у пробірці, щоб отримати 1+100 розведення та ретельно перемішати вортексним міксером.

8 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Уважно прочитайте інструкцію із застосування перед проведенням аналізу. Надійність результату залежить від суворого дотримання інструкції із застосування, як описано. Нижченаведена процедура тестування перевірена лише для ручної процедури. Якщо ви виконуєте випробування на автоматичних системах ELISA, ми рекомендуємо збільшити кроки промивання з трьох до п'яти, а обсяг промивного буферу з 300 мкл до 350 мкл, щоб уникнути ефектів промивання. Зверніть увагу на розділ 12. Перед початком аналізу план розповсюдження та ідентифікації всіх зразків та стандартів/контролів (рекомендовані дублікати) слід ретельно встановити на макеті планшета, що входить до набору. Виберіть необхідну кількість смужок або лунок для мікротитрування та вставте їх у тримач.

Виконайте всі кроки аналізу в наведеному порядку та без затримок.

Для додавання кожного стандарту/контролю та зразка слід використовувати чистий одноразовий наконечник.

Налаштуйте інкубатор до 37°C ± 1°C.

- Додайте 100 мкл стандартів/контролів та розведених зразків у відповідні лунки. Залишіть лунку А1 для Бланк-Субстрату.
- Накрийте лунки плівкою, яка постачається у наборі.
- Інкубуйте протягом 1 години ± 5 хв при температурі 37°C ± 1°C.**
- Після завершення інкубації, зніміть фольгу, аспіруйте вміст лунок і кожен лунку промийте тричі з 300 мкл промивного буферу. Уникайте переливу з реакційних лунок. Інтервал між промиванням та аспірацією повинен становити > 5 секунд. Наприкінці, обережно видаліть залишки рідини, постукаючи смужками по папері перед наступним кроком!
Примітка: Промивання важливе! Недостатня кількість промивань призводить до поганої точності та помилкових результатів.
- Додайте 100 мкл Кон'югату у всі лунки, окрім лунок А1 для Бланк-Субстрату.
- Інкубувати протягом 30 хв при кімнатній температурі (20°C - 25°C) у темряві.** Не піддавати впливу прямого сонячного світла.
- Повторити крок 4.
- Додайте 100 мкл розчину ТМБ субстрату у всі лунки.
- Інкубувати протягом 15 хвилин при кімнатній температурі (20°C - 25°C) у темряві.** Синій колір з'являється внаслідок ферментативної реакції.
- Додати 100 мкл Стоп-розчину у всі лунки у тому ж порядку і з тією ж швидкістю, що і для розчину ТМБ субстрату, таким чином відбувається зміна кольору з синього на жовтий.
- Виміряйте абсорбцію при 450/620 нм протягом 30 хв після додавання Стоп-розчину.

8.1 Вимірювання

Налаштуйте зчитувач мікротитрових планшетів ELISA **на нуль** за допомогою **Бланк-Субстрату**.

Якщо з технічних причин зчитувач мікротитрових планшетів ELISA не можна налаштувати на нуль за допомогою Бланк-Субстрату, відніміть його значення поглинання від усіх інших значень абсорбції, щоб отримати достовірні результати!

Виміряйте поглинання всіх лунок при **450 нм** і запишіть значення абсорбції для кожного стандарту/контролю та зразка у схему планшета.

Рекомендується біхроматичне вимірювання з використанням референсної довжини хвилі 620 нм.

Де потрібно, зчитайте **середні значення абсорбції** усіх дублікатів.

9 РЕЗУЛЬТАТИ

9.1 Критерії запуску валідації

Для того, щоб аналіз вважався дійсним, необхідно суворо дотримуватись цих Інструкцій із застосування та таких критеріїв:

- Субстрат-бланк:** Значення абсорбції < **0.100**
- Негативний контроль:** Значення абсорбції < **0.200 та < Cut-off**
- Cut-off контроль:** Значення абсорбції **0.150 – 1.300**
- Позитивний контроль:** Значення абсорбції > **Cut-off**

Якщо ці критерії не виконуються, тест недійсний і його потрібно повторити.

9.2 Обчислення результатів

Cut-off значення - це середнє значення поглинання визначень Cut-off контролю.

Приклад: Значення абсорбції Cut-off контролю 0.44 + значення абсорбції Cut-off контролю 0.42 = 0.86/2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1 Результати в одиницях [ДО]

Значення абсорбції зразка x 10 = [DRG одиниці = ДО]
Cut-off

Приклад: $1.591 \times 10 = 37 \text{ ДО}$
0.43

9.3 Інтерпретація результатів

Cut-off	10 ДО	-
Позитивний	>11 ДО	Присутні антитіла проти збудника. Відбувся контакт з антигеном (вакцина проти патогенів).
Сумнівний	9 – 11 ДО	Антитіла проти збудника чітко виявити не вдалося. Рекомендується повторити тест зі свіжим зразком через 2-4 тижні. Якщо результат знову неоднозначний, зразок оцінюється як негативний .
Негативний	< 9 ДО	Зразок не містить антитіл проти збудника. Попередній контакт з антигеном (вакцина проти патогенів) малоймовірний.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на основі єдиного результату тесту. Точний діагноз повинен враховувати історію хвороби, симптоматику та серологічні дані. У пацієнтів з ослабленим імунітетом та новонароджених серологічні дані мають лише обмежене значення.

10 СПЕЦИФІЧНІ РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Результати відносяться до груп досліджуваних зразків; це не гарантовані специфікації. Для отримання додаткової інформації про специфічні робочі характеристики зверніться до DRG.

10.1 Точність

В аналізі	К-сть	Середнє (E)	КВ (%)
#1	24	0.295	3.54
#2	24	0.539	4.55
#3	24	0.657	6.16
Між аналізами	К-сть	Середнє (ДО)	КВ (%)
#1	12	18.48	2.77
#2	12	6.35	8.02
#3	12	22.58	4.03

10.2 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність визначається як ймовірність аналізу показати негативний результат за відсутності конкретного аналізу. Це 95.0% (95% довірчий інтервал: 87.69% - 98.62%).

10.3 Діагностична чутливість

Діагностична чутливість визначається як ймовірність аналізу показати позитивний результат в присутності конкретного аналізу. Це 100% (95% довірчий інтервал: 47,82% - 100%).

10.4 Інтерференції

Інтерференції з гемолітичними, ліпемічними або жовтяничними зразками не спостерігається до концентрації 10 мг/мл гемоглобіну, 5 мг/мл тригліцеридів та 0.5 мг/мл білірубину.

10.5 Перехресна реактивність

Не можна виключити перехресну реакцію з антитілами проти *Toxosaga canis*, трихинели, фасціоли, філарії та стронгілоїду.

11 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Забруднення бактеріями або повторні цикли заморожування-розморожування зразка можуть вплинути на значення поглинання.


12 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

- Слід чітко дотримуватися процедури тестування, інформації, застереження та попередження в інструкції з використання. Використання тестових наборів з аналізаторами та подібним обладнанням має бути підтверджено. Будь-які зміни в побудові, складі та процедурі тестування, а також будь-яке використання в поєднанні з іншими продуктами, не схваленими виробником, не дозволяються; користувач сам несе відповідальність за такі зміни. Виробник не несе відповідальності за хибні результати та інциденти з цих причин. Виробник не несе відповідальності за будь-які результати шляхом візуального аналізу зразків пацієнтів.
- Тільки для діагностики *in vitro*.
- Усі матеріали людського або тваринного походження слід розглядати та обробляти як потенційно інфекційні.
- Усі компоненти людського походження, що використовуються для виробництва цих реагентів, були протестовані на антитіла до ВІЛ, антитіла до HCV та HBsAg, і виявлено, що вони не є реактивними.
- Не змішувати реагенти та мікротитрові планшети з різними номерами лотів.
- Не використовувати реагенти інших виробників разом з реагентами даного набору.
- Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності вказаного на етикетці.
- Використовувати тільки чисті наконечники для піпеток, диспенсери та лабораторну посуду.
- Не змішувати ковпачки флаконів з реагентами, щоб уникнути перехресного забруднення.
- Закривати флакони з реагентами одразу після використання, щоб уникнути випаровування та перехресного забруднення.
- Після першого відкриття та подальшого зберігання перед наступним використанням перевірте флакони з кон'югатом та стандартами/контролями флакони на мікробне забруднення.
- ІФА призначений тільки для кваліфікованого персоналу, який відповідає стандартам належної лабораторної практики (GLP).
- Для подальшого внутрішнього контролю якості кожна лабораторія повинна додатково використовувати відомі зразки.

12.1 Примітки щодо безпеки реагентів, які містять небезпечні речовини

Реагенти можуть містити СМІТ/МІТ (3:1) або МІТ (див. 4.1)

Крім того, застосовуються характеристики безпеки та попереджувальні фрази.

	H317	Може викликати алергічну реакцію шкіри.
	P261	Уникайте вдихання розпилювача
	P280	Одягати захисні рукавиці/захисний одяг
	P302+P352	НА ШКІРУ: промити водою з милом.
	P333+P313	Якщо з'явилося подразнення шкіри або почервоніння: Звернутися до лікаря.
	Застереження P362+P364	Зняти забруднений одяг та випрати його перед наступним використанням.

Більше інформації дивитися у Паспорті безпеки.

12.2 Утилізація

Залишки хімічних речовин та препаратів зазвичай вважаються небезпечними відходами. Утилізація цього виду відходів регулюється національними та регіональними законами та нормативними актами. Зверніться до місцевих органів влади щодо утилізації небезпечних відходів.



ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/170 00 50
www.drg-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

