

НАБІР РЕАГЕНТІВ

ГАРДІЯ ЛЯМБЛІЯ (КАЛ) АНТИГЕН ELISA

Gardia lamblia Ag (Stool) ELISA

Каталог. № : **EIA-3477**

Дата випуску інструкції: **2020/08**

Кількість : **96**

Версія **7.0**



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

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей ІФА є імуноаналізом *in vitro* для якісного визначення антигену *Giardia* у зразках калу.

2 КОРОТКИЙ ОПИС ТА ПОЯСНЕННЯ

Giardia lamblia - це найпростіший паразит, що спричиняє захворювання лямбліоз. Симптоми гострого лямбліозу включають діарею, нудоту, втрату ваги, мальабсорбцію, спазми в животі, метеоризм та анемію. Захворювання може проявлятися як в гострій, хронічній так і безсимптомній формі. Лямбліоз є найпоширенішим паразитарним захворюванням у Сполучених Штатах, і є причиною приблизно 100 мільйонів легких і 1 мільйона гострих інфекцій щороку.

Шлях передачі *Giardia* - фекально-оральний: цисти попадають у їжу. Епідемії лямбліозу фіксуються у дитячих садочках та при питті забрудненої води. У дитячих садочках прямо чи опосередковано фіксується до 45% діагностованих лямбліозних інфекцій у Сполучених Штатах. Одне дослідження показало, що у 54% дітей у дитячому садочку була інфекція.

Діагностика лямбліозу проводиться за допомогою ряду інвазивних і неінвазивних методів. З неінвазивних методів найпоширенішим є дослідження калу під мікроскопом. Однак цей метод залежить від досвідченості фахівця та подальше дослідження цілого організму. Через історично низьку кваліфікацію правильних мікроскопічних досліджень та періодичне виділення організмів досліджували альтернативні методи діагностики.

Однією з важливих альтернатив став метод захоплення антигену за допомогою ензим-зв'язуючого імуносорбентного аналізу (ІФА) для використання з калом. Ці тести показали порівнянну чутливість з досвідченими мікроскопічними дослідженнями, вони досить прості у виконанні і не вимагають при цьому дослідження всього організму.

3 ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРИ

Під час першої інкубації, специфічний антиген *Giardia*, присутній у зразках калу, захоплюється моноклональними антитілами, розташованими в мікролунках. Лунки інкубують і промивають перед додаванням поліклональних антитіл до *Giardia*, кон'югованих з пероксидазою хрому. Кон'югат ферменту утворює "сендвіч" з будь-якого антигену, зв'язаного з лунками. Після промивання для видалення незв'язаного ферменту додають хромоген, який набуває синього кольору в присутності ферментного комплексу. Стоп-розчин зупиняє реакцію і перетворює синій колір на жовтий. Якщо антиген не захоплений, або якщо недостатній рівень антигену, кольорова реакція не відбудеться.

4. РЕАГЕНТИ

Елемент	Опис	Символ
Тест-смужки	Мікролунки, що містять моноклональні антитіла до <i>Giardia</i> : 96 тест-лунок у тримачі для тест-смужок.	MT PLATE
Ферментний кон'югат	Один (1) флакон, що містить 11 мл (mL) поліклональних антитіл до <i>Giardia</i> , кон'югованих з пероксидазою хрому з консервантом.	CONJ
Позитивний контроль	Один (1) флакон, що містить 2 мл (mL) розведеного формалінізованого супернатанту калу з позитивним антигеном <i>Giardia</i> .	CONTROL +
Негативний контроль	Один (1) флакон містить 2 мл (mL) розведеного буфера.	CONTROL -
Хромоген	Одна (1) пляшка, що містить 11 мл (mL) тетраметилбензидину (ТМБ) і перекису.	SUBS TMB

Промивний концентрат (20X)	Дві (2) пляшки, що містять 25 мл (mL) концентрованого буфера з детергентом і тимеросалом.	WASH BUF
Буфер для розведення	Чотири (4) пляшки, що містять 30 мл (mL) буферінізованого білкового розчину з тимеросалом.	SPECM DIL
Стоп-розчин	Один (1) флакон, що містить 11 мл (mL) 5% розчину фосфорної кислоти.	SOLN

5 ПОПЕРЕДЖЕННЯ/ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Не відступати від зазначених процедур під час проведення цього аналізу. Усі розведення зразків, час інкубації/температура та промивання були оптимізовані для досягнення найкращих характеристик. Відхилення від зазначених процедур можуть вплинути на чутливість і специфічність аналізу.
- Тільки для діагностики *in vitro*.
- Не замінювати реагенти між наборами з різними номерами лотів.
- Не використовуйте реагенти, термін придатності яких закінчився. Терміни придатності вказані на етикетці кожного реагенту. Використання реагентів після закінчення терміну їх придатності може вплинути на результати.
- Невикористані лунки зберігати в закритому пакеті, щоб захистити від попадання вологи.
- Не використовувати розчини у яких з'явився осад або вони помутніли.
Виняток: концентрат для промивання може випадати в осад під час зберігання в холодильнику, але осад розчиняється при нагріванні.
- Не додавайте азиди до зразків або будь-яких реагентів.
- Контролі та деякі реагенти містять тимеросал в якості консерванту, який може викликати подразнення шкіри, очей та слизових оболонок. У разі контакту, слід промити очі або шкіру великою кількістю води.
- Обробляйте всі реагенти та зразки як потенційно інфекційні матеріали. Будьте обережні, щоб запобігти появі аерозолів і знезаразити будь-які розливи зразків.
- Стоп-розчин являє собою 5% розчин фосфорної кислоти у воді. У разі потрапляння на шкіру змити великою кількістю води. Якщо кислота потрапила в очі, то слід промити їх великою кількістю води та звернутися до лікаря.
- Люди з дальтонізмом або з вадами зору можуть бути не в змозі прочитати тест візуально і повинні використовувати спектрофотометричні показники для інтерпретації результатів.

6 УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Реагенти, смужки та компоненти в пляшках повинні зберігатися при температурі 2 °C (°C) - 8 °C (°C).

Гнучку пляшку, що містить розведений буфер для промивання, можна зберігати при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)).

7 ПІДГОТОВКА

Перед використанням доведіть всі реагенти та зразки до кімнатної температури (15 °C (°C) - 25 °C (°C)) та перемішайте.

(20X) Промивний концентрат може випадати в осад під час зберігання в холодильнику, але повертається в розчин, якщо його довести до кімнатної температури (15-25°C (°C)) і перемішати. **Переконайтеся, що (20X) промивний концентрат повністю знаходиться в розчині перед розведенням до робочої концентрації.**

Щоб розбавити (20X) концентрат для промивання до робочого розведення, зніміть ковпачок та додайте вміст однієї пляшки з концентратом промивання в гнучку пляшку, що містить 475 мл (mL) дистильованої води. Покрутити, щоб перемішати. Гнучка пляшка повинна мати вузький наконечник для оптимізації промивань.

8 ЗАБІР КАЛУ (ФЕКАЛІЙ)

Немає необхідності змінювати методи забору, які використовуються для стандартних мікроскопічних O&P досліджень.

Зразки калу можна використовувати як незаконсервовані, так і заморожені, у транспортному середовищі Кері-Блера, або в консерваційному середовищі з 10% формаліном або SAF.

Незаконсервовані зразки слід зберігати при температурі 2 °C (°C) - 8 °C (°C) та тестувати протягом 24 годин після забору.

Зразки, які неможливо тестувати протягом цього часу, слід заморожувати при температурі -20 °C (°C) або нижче до використання. Уникайте багаторазових циклів заморожування/розморожування.

Формалізовані та консервовані SAF зразки можна зберігати при кімнатній температурі (15-25 °C (°C)) або при 2 °C (°C) - 8 °C (°C) і тестувати протягом 18 місяців після забору.

НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ законсервовані зразки.

Зразки в середовищі Кері-Блера слід зберігати при температурі 2 °C (°C) - 8 °C (°C) або -20 °C (°C) і тестувати протягом 1 тижня після забору.

Уникати повторних циклів заморожування/розморожування.

9 ПРОЦЕДУРА

9.1 Матеріали, що постачаються в наборі

- Набір ІФА з антигеном *Giardia lamblia* (див. Розділ «РЕАГЕНТИ»)

9.2 Необхідні матеріали, що не постачаються в наборі

- Піпетки для перенесення проб
- Гнучка пляшка для промивання смужок (рекомендовано з вузьким наконечником)
- Мірна колба
- Дистильована вода
- Мікропіпетки
- Аплікатори (рекомендовано) або тампони для підготовки зразків
- Пробірки для розведення зразків

9.3 Рекомендоване обладнання

Зчитувач для ІФА планшетів, здатний зчитувати біхроматично при 450/620 - 650 нм (nm).

9.4 Процедура аналізу

9.4.1 Примітки

- Усі інкубації проводять при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)).
- Перед використанням переконайтеся, що всі зразки та реагенти мають кімнатну температуру (15 °C (°C) - 25 °C (°C)). Перед використанням заморожені зразки необхідно повністю розморозити.
- Усі розведення калу необхідно проводити за допомогою наданого буфера для розведення. Не використовуйте буфер для розведення з набору з іншим номером лоту.
- При необхідності підготовлені зразки можна центрифугувати при 2000 - 3000 g протягом 5 - 10 хвилин. Перед використанням переконайтеся, що супернатант прозорий.
- Під час проведення аналізу намагайтеся уникати утворення бульбашок у лунках. Бульбашки можуть вплинути на загальну продуктивність і зчитування кінцевих результатів. Викладаючи лунки на чистий абсорбуючий рушник після кожного етапу миття, слід звести до мінімуму бульбашки в лунках.
- При кожному запуску набору необхідно включати контролю. Контролі надаються готовими до використання. НЕ розбавляти далі.
- **Незаконсервовані та консервовані зразки мають різні процедури тестування. Нижче наведені конкретні інструкції щодо проведення аналізу з використанням кожної процедури.**

9.4.2 Процедура аналізу законсервованих зразків

1. Для зразків у SAF, 10% розчині формаліну або середовищі Кері-Блера, ретельно перемішати вміст всередині контейнера. Подальшої обробки не потрібно.
2. Відірвати необхідну кількість лунок (кількість зразків плюс 2 для контролів) та розмістити на тримачі.
3. За допомогою мікропіпетки додайте **100 мкл (µL)** негативного контролю в лунку № 1 і **100 мкл (µL)** позитивного контролю в лунку № 2.
4. За допомогою мікропіпетки додайте **50 мкл (µL)** буферу для розведення в кожну лунку для зразка. **НЕ додавати буфер для розведення в контрольні лунки.**
5. Додати **50 мкл (µL)** зразка у кожну лунку з буфером для розведення.
6. Інкубувати протягом **60 хвилин** при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)), потім промити.* Після останнього промивання викласти лунки на чистий абсорбуючий рушник, щоб видалити надлишок промивного буфера.
7. Додати **2 краплі** Ферментного Кон'югату у кожну лунку.
8. Інкубувати протягом **30 хвилин** при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)), потім промити.* Після останнього промивання викласти лунки на чистий абсорбуючий рушник, щоб видалити надлишок промивного буфера.
9. Додати **2 краплі** Хромогену у кожну лунку.
10. Інкубувати протягом **10 хвилин** при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)).
11. Додати **2 краплі** Стоп-розчину в кожну лунку. Змішати лунки, обережно постукуючи вказівним пальцем по тримачу смужок протягом **15 секунд**. Зчитати реакцію протягом **5 хвилин** після додавання стоп-розчину.
12. Зчитати результати візуально або за допомогою зчитувача ІФА планшетів (дивитися інструкції нижче).

9.4.3 Процедура аналізу незаконсервованих зразків:

1. Приготуйте розведення зразків у пробірках, використовуючи **0.7 мл (mL)** буфера для розведення та 0.1 г (g), приблизно розміром з невелику горошину, зразка калу за допомогою аплікатора. Перед використанням ретельно перемішати.
-ПРИ ВИКОРИСТАННІ МАЗКІВ, додайте **1 мл (mL)** буфера для розведення в пробірку для розведення. Покрити мазок тонким шаром зразка і перемішати в буфері для розведення, видавивши якомога більше рідини. Перед використанням ретельно перемішати.
2. Для водянистих незаконсервованих зразків змішати вміст, а потім додайте **0.1 мл (mL)** зразка до **0.7 мл (mL)** буфера для розведення в пробірках для розведення. Перед використанням ретельно перемішати.
3. Відірвати необхідну кількість лунок (кількість зразків плюс 2 для контролю) і помістити у тримач.
4. За допомогою мікропіпетки, додати **100 мкл (µL)** негативного контролю у лунку №1.
5. За допомогою мікропіпетки, додати **100 мкл (µL)** позитивного контролю у лунку №2.
6. Додати 100 мкл (µL) розведеного зразка у кожну лунку.
7. Інкубувати **60 хвилин** при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)), потім промити.*
Після останнього промивання викласти лунки на чистий абсорбуючий рушник, щоб видалити надлишок промивного буфера.
8. Додати **2 краплі** ферментного кон'югату у кожну лунку.
9. Інкубувати **30 хвилин** при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)), потім промити.*
Після останнього промивання викласти лунки на чистий абсорбуючий рушник, щоб видалити надлишок промивного буфера.
10. Додати **2 краплі** Хромогену у кожну лунку.
11. Інкубувати протягом 10 хвилин при кімнатній температурі (15 °C (°C) - 25 °C (°C)).
12. Додайте **2 краплі** Стоп-розчину в кожну лунку. Змішайте лунки, обережно постукуючи вказівним пальцем по тримачу смужок протягом **15 секунд**. Зчитати реакцію протягом **5 хвилин** після додавання стоп-розчину.
13. Зчитати результати візуально або за допомогою зчитувача ІФА планшетів (дивитися інструкції нижче).

**Промивання складаються з посиленого заповнення, переповнення та декантації вмісту кожної лунки п'ять (5) окремих разів. По можливості уникайте утворення бульбашок у лунках, оскільки це може вплинути на кінцеві результати.*

10 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Позитивний та негативний контроль необхідно включати щоразу під час проведення аналізу. Використання позитивного та негативного контролю дозволяє легко перевірити стабільність набору.

Негативний контроль повинен бути безбарвним при візуальному зчитуванні і має бути менше 0.08 ОЩ при зчитуванні на подвійній довжині хвилі 450/620 - 650 нм (nm).

Позитивний контроль має бути чітко видимого жовтого кольору і зчитуватися на відстані більше 0.5 ОЩ при зчитуванні на подвійній довжині хвилі 450/620 - 650 нм (nm).

11 РЕЗУЛЬТАТИ

11.1 Інтерпретація результатів - візуально

Позитивний: Будь-яка лунка зразка, яка, очевидно, більш жовтіша, ніж лунка негативного контролю.

Негативний: Будь-яка лунка зразка, яка, не є очевидно, більш жовтішою, ніж лунка негативного контролю.

ПРИМІТКА: Негативний контроль, а також деякі зразки можуть мати незначне забарвлення. Лунка для зразка повинна бути темнішою, ніж лунка для негативного контролю, щоб досягнути позитивного результату.

11.2 Інтерпретація результатів – ІФА зчитувач

Виставити зчитувач на нуль. **Зчитувати всі лунки за допомогою біхроматичного зчитування з фільтрами при 450 нм (nm) і 620 - 650 нм (nm).**

Позитивний: Показники поглинання 0.08 ОЩ і вище вказують, що зразок містить антиген *Giardia*.

Негативний: Показники поглинання менше 0.08 ОЩ вказують на те, що зразок не містить виявлених рівнів антигену *Giardia*.

12 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

- Результати тесту повинні використовуватися як допомога в діагностиці і не повинні інтерпретуватися як діагностика самі по собі.
- НЕ концентруйте зразки калу. Аналіз не дасть точних результатів на концентрованому зразку.

- Негативний результат може бути при рівні антигену нижче межі виявлення цього аналізу. Пацієнтам, у яких є підозра на наявність *Giardia*, можна проводити декілька аналізів через певний проміжок часу.

13 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

У здорових людей *Giardia* відсутня і повинен бути негативний результат. Позитивна реакція вказує на те, що пацієнт виділяє помітну кількість антигену *Giardia*. Деякі групи населення, наприклад діти, які перебувають у дитячих закладах, мають вищі показники зараження *Giardia*, ніж звичайне населення. Будь ласка, зверніться до розділу Короткий опис, щоб отримати посилання.

14 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Дослідження 1:

Дослідження проводили за допомогою аналізу *Giardia* EIA-3477 із використанням свіжих/заморожених зразків, зразків, законсервованих у 10% розчині формаліну та SAF, та зразків у транспортних середовищах Кері-Блера. У дослідженні було використано загалом 90 зразків, які були визначені як позитивні, так і негативні на *Giardia* за допомогою мікроскопії. З 90 зразків було визначено, що 26 були позитивними на *Giardia*, а 64 – негативними на *Giardia*. Результати дослідження наведені в наступній таблиці.

		Мікроскопія	
		+	-
EIA-3477	+	26	0
	-	0	64

Чутливість: 100% (26/26)

Специфічність: 100% (64/64)

Дослідження 2:

Було проведено дослідження, у якому порівнювали аналіз *Giardia* EIA-3477 з іншим комерційно доступним ІФА. Дослідження проводили із використанням свіжих/заморожених зразків та зразків, законсервованих у 10% розчині формаліну та SAF. Всього в дослідженні було використано 86 зразків, які були ідентифіковані як позитивні, так і негативні на *Giardia* за допомогою мікроскопії. З 86 зразків 22 були визначені позитивними на *Giardia* і 64 були негативними на *Giardia*. Результати дослідження наведені в наступній таблиці.

		EIA-3477	
		+	-
Інший комерційний ІФА	+	22	0
	-	0	64

Позитивне узгодження: 100% (22/22)

Негативне узгодження: 100% (64/64)

Відтворюваність

КВ в аналізі (від лунки до лунки) обчислювали з використанням 4 позитивних і 4 негативних зразків, проаналізованих 24 рази за один цикл. Середній показник КВ склав 3.67%, а найвищий – 6.18%.

КВ між аналізами (від циклу до циклу) обчислювали з використанням 4 позитивних і 4 негативних зразків, проаналізованих протягом трьох окремих днів. Середній показник КВ склав 4.08%, а найвищий – 11.61%.

Перехресна реактивність

Не було виявлено перехресних реакцій з такими мікроорганізмами:

Entamoeba hartmanni, *Endolimax nana*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Chilomastix mesnili*, *Strongyloides stercoralis*, *Cryptosporidium*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Diphyllobothrium species*, *Hymenolepis nana*, *Clonorchis sinensis*, *Enteromonas hominis*, *Trichuris trichiura*, *Iodamoeba buetschlii*, *Hookworm*, *Schistosoma mansoni*, Ротавірус, яйця *Taenia*, яйця *Fasciola*, *Isospora belli*, *Entamoeba polecki*, Аденовірус, та 33 види бактерій (список доступний за запитом).

15 ВИЗНАЧЕННЯ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Проблема: негативний контроль має надмірне забарвлення після утворення.

Причина: неправильне промивання.

Виправлення: інтенсивніше промивати. Видалити зайву рідину з лунки, постукуючи по абсорбуючому рушнику. Не допускати пересихання тест-лунок.



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: drg@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

