

ACANTHOICHEILONEMA VITEAE

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus filariazei nustatyti

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 9400
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Acanthocheilonema viteae* ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš įvairių filarial nematodų žmogaus kraujo serume nustatymui (Bancroftian ir Malayan filariasis, Loaosis, Onchocercosis ir Mansonellosis). Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

Kilmė:

Filaziazę sukelia į siūlą panašios, apvalios suaugusios kirmėlės, kurios nuolatos gamina mikroskopiškai mažas mikrofilarias. Daugelį, pasaulyje žinomų infekcijų sukelia *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ir *Brugia timori*. Žmogus gali užsikrėsti nuo kito žmogaus per uodo įkandimą. Suaugusios kirmėlės dažniausiai gyvena žmogaus limfinėse kraujagyslėse, o subrendusios moteriškosios kirmėlės gamina milijonus mikrofilarijų, kurios cirkuliuoja kraujyje, tokiu būdu užkrėsdamos uodus po įkandimo. Daugumai užsikrėtusių žmonių nepasireiškia aiškūs simptomai. Tačiau kai kuriais atvejais užsikrėtusiems žmonėms pasireiškia limfedema, elefantiazė ar patinimas. Aktyvios infekcijos diagnozavimas pagrįstas mikrofilarijų nustatymu kraujyje, atliekant mikroskopinį tyrimą ir teigiamu rezultatu, atliekant serologinius tyrimus.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) ląstelėse mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Acanthocheilonema viteae* somatiniais antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintas konjugatas. Sūri ti antikūnai atlaisvinami pridėdami pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Acanthocheilonema viteae* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9400-01	Ląstelės ELISA juostelės su <i>Acanthocheilonema viteae</i> somatiniais antigenais	96	ulinėliai
DILB	9400-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9400-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9400-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9400-05	Stabdomasis tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9400-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9400-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9400-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9400-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutėsono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruoimas prieš naudojimą:

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio mai elio 9400-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruo tus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, uždėdyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9400-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9400-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9400-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 9400-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9400-10 neskiestame fermento buferyje 9400-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9400-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruoimas:

Naudoti ūmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar ūemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N _a N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9400-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	9400-03	0,05 %	/
Fermento buferis	9400-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9400-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	9400-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9400-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9400-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Blokavimas:

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną ulinėį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 12 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prieš orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: www.bordier.ch.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9400-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo filariazės ir sveikumo serumų. Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra mažesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie ***Acanthocheilonema viteae*** somatinius antigenus yra kliniškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie ***Acanthocheilonema viteae*** somatinius antigenus yra laikoma kliniškai reikšminga. Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitu.

Kiekvienoje laboratorijoje gali būti apibrėžta pilkoji zona priklausomai nuo pacientų populiacijos. Jei rezultatai yra tarpiniai ar keliantys abejonių, rekomenduojame pakartotinai atlikti testą po 2-4 savaičių su nauju mėginiu.

Jautrumas ir specifiškumas:

95% jautrumas nustatytas testuojant 22 pacientų serumų su filariaze (pacientai su mikrofilaremija ir / arba turintys teigiamą, kitais būdais atliktą serologinį ir epidemiologinį tyrimą ir filariozę). 98% specifiškumas nustatytas, testuojant 180 kraujo donorų serumų (šveicarų).

Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipemini ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	0.525	1.535	0.764	1.905
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0.026	0.070	0.068	0.112
Pokyčio koeficientas (%)	5.0	4.5	8.9	5.9

Apribojimai:

69% specifiškumas nustatytas testuojant 75 pacientų serumų su kitomis parazitinėmis infekcijomis. Kryžminis reaktyvumas gali įvykti pacientams su ascarioze, trichinelioze, ankilostomoze, faskioliaze ir cistine echinokokoze. Neigiama serologija gali pasireikšti ligoniams, sergantiems mikrofilarija.

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

Literatūros altiniai:

Gueglio, B., Bordier, C. et Marjolet, M. (1995) Mise au point d'un test ELISA pour le diagnostic des filarioses humaines. Bulletin de la société Française de parasitologie. **13** : 67-72.

Laverbratt, C., Ljungström, I., Guzman, G., Thors, C., Eriksson, T. et Akuffo, H. O. (1997) Evaluation of serological assays for diagnosis of onchocercosis. Scand. J. Infect. Dis. **29** : 65 -70.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

