

# Acanthocheilonema viteae IgG ELISA

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 - UDI-DI: 07640158219409



## Naudojimo paskirtis:

Bordier *Acanthocheilonema viteae* IgG 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:

Filariazę sukelia į siūlą panašios, apvalios suaugusios kirmėlės, kurios nuolatos gamina mikroskopiškai mažas mikrofilarijas. 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) laukuose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Acanthocheilonema viteae* somatiniais antigenais iš suaugusių patelių, 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 nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėdant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Acanthocheilonema viteae* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

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

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

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

## Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir ištirti maišomi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio maišelio 9400-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į dėmelį teisinga kryptimi. Ištirti 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 fosfatázės 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 fosfatázės substrato tabletę(es) 9400-10 neskiestame fermento buferyje 9400-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti iš dalies hidrolizuotas, todėl reikia išmesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

**Stabdomasis tirpalas:** reagentą 9400-05 naudoti neskiestą.

## Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatšildykite bandinių pakartotinai. Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

## Išspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiški junginiai atsiranda naudojant šią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>3</sub> N <sub>3</sub> )	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 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9400-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galima infekcinę medžiagą.
- Nemašyti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su šio rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitalioti dangtelių, kad būtų išvengta užteršimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis šalies 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 iš siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

### 2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėlį (mėginį be serumo).

Į kitus tris iš 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 ulinėlį (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 ulinėlį.

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

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

### 5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

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

## Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutinės absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 19% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 10% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: [www.bordier.ch](http://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 sveiko žmogaus 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 žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Acanthocheilonema viteae* antigenus yra kliniškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Acanthocheilonema viteae* antigenus yra laikoma kliniškai reikminga. 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.

Jeigu rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

## Analitiniai pasirodymai:

### Analitinis specifiškumas:

69% specifiškumas nustatytas 75 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems askaridoze, trichinelioze, acilostomioze, fasciolioze ir cistine echinokokoze.

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

### 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 (absorbicija)	0,525	1,535	0,764	1,905
Standartinis nuokrypis (absorbicijos)	0,026	0,070	0,068	0,112
Pokyčio koeficientas (%)	5,0	4,5	8,9	5,9

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijškumas

## Klinikiniai pasirodymai:

### Diagnostinis jautrumas:

Nustatytas 95% jautrumas 22 pacientų, sergančių filarioze (pacientų, sergančių mikrofilaremija ir (arba) serologiniais rezultatais, naudojant kitus metodus, ir epidemiologinio bei klinikinio filariozės fono), serumuose.

### Diagnostikos specifiškumas:

180 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 98% specifiškumas.

### Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 98% PPV ir 99% NPV.

### Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 99 Šveicarijos kraujo donoriai ir 100 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,38. Paveiktoje 12 pacientų, sergančių filariozėmis, serumų populiacijoje numatoma Indekso vertė yra 1,87.

### Incidentai:

Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

### Apribojimai:

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 šaltiniai:

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.

Gobbi, F., Tamarozzi, F., Buonfrate, D., Rodari, P., Tais, S. and Bisoffi, Z. (2019) Laboratory Parameters after Treatment for Loa loa and Mansonella perstans: The Experience of a Single Referral Center for Tropical Diseases in a Non-Endemic Area. Am. J. Trop. Med. Hyg. **100** : 914-920.

Gobbi, F., Buonfrate, D., Boussinesq, M., Chesnais, C.B., Pion, S. D., Silva, R. et al. (2020) Performance of two serodiagnostic tests for loiasis in a Non-Endemic area. Plos Negl. Trop. Dis. **14** : e0008187.



**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

