

Strongyloides ratti IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus strongiloidozei nustatyti

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



Naudojimo instrukcija produktui N° 9450
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/10285 - UDI-DI: 07640158219454



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Strongyloides ratti* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prie *Strongyloides* nematodų žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

Kilmė:

Strongiloidozę sukelia *Strongyloides stercoralis* nematodas. Žmonės gali užsikrėsti sąlytyje su dirvožemiu, užkrėstu *Strongyloides* lervomis, kurios laisvai patenka į kūną per atvirą odą, pav., per basas pėdas. Daugumai užsikrėtusių žmonių nepasireiškia jokie simptomai, arba jie pasireiškia nežymiai (pilvo skausmas, pykinimas, viduriavimas, kosulys ar bėrimas). Tačiau, kai kuriais atvejais, hiperinsekcijos sindromas ir išplitusi strongiloidozė gali pasireikšti žmonėms, kurie gydomi kortikosteroidais ar jiems taikomos kitos imunosupresinės terapijos arba tiems, kurie serga AIDS ar kita imunodeficito forma. Diagnozė pagrįsta parazitinių lervų aptikimu išmatose ir teigiamu rezultatu, atliekant serologinius tyrimus.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) laukuose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Strongyloides ratti* somatiniais lervų 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 nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėdami pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Strongyloides ratti* 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	9450-01	Laukoms ELISA juostelės su <i>Strongyloides ratti</i> somatiniais lervų antigenais	96	ulinėliai
DILB	9450-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9450-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9450-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9450-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9450-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9450-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9450-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - 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 vieta. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės 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 skalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

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

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maišelio elio 9450-01 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. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9450-02 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) 9450-03 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 9450-06 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 9450-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9450-10 neskiestame fermento buferyje 9450-04 (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 i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9450-05 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 neatildykite bandinių pakartotinai. Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₂ N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9450-02	0,1%	0,02%
Plovimo tirpalas (10 x)	9450-03	0,05%	/
Fermento buferis	9450-04	0,01%	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9450-06 iki -08	0,1%	0,02%
Konjugatas (50 x)	9450-09	0,1%	/

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

- Stabdomasis tirpalas 9450-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9450-06 iki -08) yra iš triušų.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galima infekcinę medžiagą.
- Nemašyti 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 i vengta 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.

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 ulinėį (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 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 stabdymo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

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

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 18% 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.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9450-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo strongiloidozės 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 mažesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Strongyloides ratti** antigenus yra kliniškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Strongyloides ratti** 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.

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:

70% specifiškumas nustatytas 89 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems šistosomioze, filarioze, toksokaroze, fasciolioze ir amebiaze.

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)	0,738	1,320	0,768	1,339
Standartinis nuokrypis (absorbicijos)	0,040	0,040	0,052	0,063
Pokyčio koeficientas (%)	5,5	3,0	6,8	4,7

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 90% jautrumas 59 pacientų, turinčių *Strongyloides stercoralis* lervų, serumuose. Esant rimtam strongiloidozės įtarimui, reikia taikyti kitus metodus (Baermann, išmatų pasėlis, daugkartiniai išmatų tyrimai).

Diagnostikos specifiškumas:

150 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 96% specifiškumas.

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 90% PPV ir 96% NPV.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 99 Šveicarijos kraujo donorai ir 98 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,33. Paveiktoje populiacijoje, kurią sudaro 7 serumai iš pacientų, sergančių strongiloidoze, numatoma Indekso vertė yra 1,41.

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:

Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., et al. (2014) Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 8.

Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Kroleiecki, A., Albonico, M., et al. (2015) Accuracy of Five Serologic Tests for the follow-up of *Strongyloides stercoralis* infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 9.

Formenti, F., Buonfrate, D., Prandi, R., Marquez, M., Caicedo, C., Rizzi, E., Guevara, A.G., Vicuña, Y., Huerlo, F.R., Perandin, F., Bisoffi, Z. and Anselmi, M. (2016) Comparison of *S. stercoralis* Serology Performed on Dried Blood Spots and on Conventional Serum Samples. Front. Microbiol. 7:1778.

Autier, B., Boukthir, S., Degeilh, B., Belaz, S., Dupuis, A., Chevrier, S., Gangneux, J. P. and Robert-Gangneux, F. (2021) Clinical value of serology for the diagnosis of strongyloidiasis in travelers and migrants: A 4-year retrospective study using the Bordier IVD *Strongyloides ratti* ELISA assay. Parasite 28, 79.



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

