

Ascaris IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus askaridozės nustatyti

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



Naudojimo instrukcija produktui N° 9250
UDI-DI: 07640158219256



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Ascaris* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kokybiniam IgG antikūnų prie *Ascaris* genties parazitų nustatymui žmogaus serume. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

Kilmė:

Askaridozė yra visame pasaulyje paplitusi helmintinė infekcija, kurią sukelia kai kurie dirvožemyje perduodami *Ascaris* genties helmintai (daugiausia *A. Lumbricoides* ir *A. suum*). Dažniausiai tai pasireiškia vaikams atogrąžų ir subtropikų regionuose, ypač vietovėse, kuriose yra prastos sanitarinės sąlygos ir higiena. Žmogus gali užsikrėsti netyčia prarydamas infekcinius kiaušinėlius, esančius užterštame dirvožemyje, vandenyje ar maisto produktuose. Nuryjus kiaušinėlius, lervos išsiritę plonojoje žarnoje ir daugiausia per kraują migruoja į kepenis, o po to į plaučius, kur gali sukelti žalą, priklausantią nuo infekcijos intensyvumo. Iš plaučių susiformavusios lervos trachėja nukeliauja į gerkles, kur dauguma jų nuryjamos ir taip pasiekia virškinimo traktą. Iš lervų plonajame žarnyne subręsta suaugusios kirmėlės, kur jos gyvena ir lytiškai dauginasi labai ilgą laiką, iki metų. Dauguma užsikrėtusių žmonių nejaučia jokių simptomų. Tačiau kai kuriais atvejais simptomai pasireiškia plaučių stadijoje (nuolatinis kosulys, dusulys ir švokštimas) arba žarnyno stadijoje (pilvo skausmas, pykinimas, vėmimas ir viduriavimas). Diagnozė pagrįsta kiaušinėlių aptikimu išmatose, požymiais ir simptomais, anamneze ir teigiamu serologinio tyrimo rezultatu.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) laukimuose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos tirpiaisiais **Ascaris** antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie šių 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 pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Ascaris* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbcija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą. Testas yra rankinis, tačiau jį galima atlikti ir automatinės sistemos, kurias turi patvirtinti naudotojas.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9250-01	Laukimos ELISA juostelės su tirpiaisiais Ascaris antigenais	96	ulinių
DILB	9250-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9250-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9250-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9250-05	Stabdomasis tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9250-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9250-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9250-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9250-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9250-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- šulinių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti nuo +2°C iki +8°C (transportas patvirtintas nuo -20°C iki +37°C 21 dieną), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėutės šono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant nuo +2°C iki +8°C.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir μl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiama ulinių inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (+37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinių sklaidavimo įranga. Sūkurinis maišytuvas. Laikmatas.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir ištirinti.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maielio 9250-01 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) 9250-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9250-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9250-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 9250-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatės substrato tabletę(es) 9250-10 neskiestame fermento buferyje 9250-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maiyti 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 9250-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Laikykite tarp +2°C iki +8°C, jei analizuojama per 7 dienas, kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumaiyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginy su 1,0 ml). Negalima laikyti praskiestus mėginius.

Išpėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9250-02	0,1%	0,02%
Plovimo tirpalas (10 x)	9250-03	0,05%	/
Fermento buferis	9250-04	0,01%	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9250-06 iki -08	0,1%	0,02%
Konjugatas (50 x)	9250-09	0,1%	/

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

Komponentas	Pavojingas komponentas	Pavojaus piktograma	Pavojaus pareišikimas	Atsargumo pareišikimas
Stabdomasis tirpalas	tribazinis kalio fosfatas		Smarkiai pažeidžia akis.	Naudoti akių apsaugos priemonės. PATEKUS Į AKIS: Atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9250-06 iki -08) yra gyvūnų kilmės (triušiai) ir turi būti tvarkomi atsargiai.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemaityti 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, nekaitalioji dangtelių, kad būtų i vengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių 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 alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Prieš inkubaciją:

Užpildykite duobutes 250 µl skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje.

Pašalinti skiedimo buferį i siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio i pirmą pirmos juostelės ulinėlj (mėginj be serumo).

Į kitus tris i 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 i praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato i kiekvieną ulinėlj (įskaitant mėginj be serumo).

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

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

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo i kiekvieną ulinėlj.

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

Sustabdyti reakciją i kiekvieną ulinėlj 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 (mėginj be serumo) mėginio reikšmę išvisų 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 > 13% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginj be serumo < 0,350

Jei mėginio skleidžiamas signalas viršija mikroplokštelių skaitytuvo matavimo diapazoną, turėtų būti priskirta vertė, atitinkanti viršutinį skaitytuvo matavimo diapazoną.

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

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9250-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) klini kai dokumentuotus serumo atvejus nuo askaridozės ir sveiko, mogaus serumų. Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginj be serumo, yra nustatomas:

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

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra ,emesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Ascaris** antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis arba lygus **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Ascaris** antigenus yra laikoma klinikiškai reik minga. 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.

Jei 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:

66% specifiškumas nustatytas 41 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems toksokaroze ir trichinelioze.

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 dubliuojami 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	0,627	1,633	0,692	1,851
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0,038	0,068	0,036	0,073
Pokyčio koeficientas (%)	6,1	4,2	5,2	3,9

Klinikiniai pasirodymai:

Diagnostinis jautrumas:

Nustatytas 81% jautrumas, kai 27 serumai buvo teigiami naudojant *Ascaris suum* neapdoroto ekstrakto antigeną ir neigiami naudojant *Toxocara canis* Bordier ELISA rinkinį.

Diagnostikos specifiškumas:

75% specifiškumas buvo nustatytas naudojant 44 serumus, kurie buvo teigiami naudojant *Ascaris suum* neapdoroto ekstrakto antigeną ir teigiami naudojant *Toxocara canis* Bordier ELISA rinkinį. 181 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 96 % specifiškumas. 98% specifiškumas buvo nustatytas naudojant 96 gydymo įstaigos infekcijų skyriaus pacientų serumus (Šveicarija).

Neigiamas rezultatas buvo nustatytas 147 iš 150 neigiamų mėginių naudojant kitą komercinį metodą, aptinkantį anti-*Ascaris* antikūnus. Teigiamas rezultatas buvo nustatytas 8 iš 9 mėginių, teigiamų naudojant šį metodą.

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 52% PPV ir 92% NPV.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 180 Šveicarijos kraujo donorų, 96 serumai iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus ir 44 serumai, teigiami su *Ascaris suum* neapdoroto ekstrakto antigenu ir teigiami naudojant *Toxocara canis* Bordier ELISA rinkinį, tikėtina Indekso vertė yra 0,46. Paveiktoje 27 serumų populiacijoje, kuri buvo teigiama naudojant *Ascaris suum* neapdoroto ekstrakto antigeną ir neigiama naudojant *Toxocara canis* Bordier ELISA rinkinį, tikėtina Indekso vertė yra 1,21.

Incidentai:

Apie bet kokią 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:

Schneider, R. and Auer, H. (2016) Incidence of *Ascaris suum*-specific antibodies in Austrian patients with suspected larva migrans visceralis (VLM) syndrome. *Parasitology Research* **115**, 1213-1219.

Dana D, Vlamincik J, Ayana M, Tadege B, Mekonnen Z, Geldhof P, et al. (2020) Evaluation of copromicroscopy and serology to measure the exposure to *Ascaris* infections across age groups and to assess the impact of 3 years of biannual mass drug administration in Jimma Town, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* **14**(4).



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

📍 Chemin de Chatanerie 2, 1023 Crissier, Switzerland.

☎ +41 21 633 31 67 ✉ cb@bordier.ch 🌐 www.bordier.ch

