

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus alveolių echinokokozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9300
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757

Naudojimo paskirtis:

Serologinei žmogaus alveolių echinokokozės (alveolinė hidatidinė liga) diagnozei (IgG). Seroepidemiologinių tyrimų žmonėms, priklausantiems rizikos grupei ir žmonėms, kuriems pasireiškė infekcijos požymiai, tikrinimas. Pooperacinė kontrolė.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 antigenais, atlikimui. Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

| | | | | |
|--------------------|---------|--|-----|------------|
| WELL | 9300-01 | Laužomos ELISA juostelės su <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18 antigenais | 96 | šulinėliai |
| DILB | 9300-02 | Koncentruotas skiedimo buferis (10 x) | 50 | ml |
| WASH | 9300-03 | Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9300-04 | Fermento buferis | 50 | ml |
| STOP | 9300-05 | Stabdomasis tirpalas (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9300-06 | Neigiamas kontrolinis serumas | 200 | μl |
| CONTROL -/+ | 9300-07 | Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė) | 200 | μl |
| CONTROL + | 9300-08 | Teigiamas kontrolinis serumas | 200 | μl |
| CONJ | 9300-09 | Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas | 300 | μl |
| SUBS | 9300-10 | Fosfatazės substratas | 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). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

ELISA šulinėliai: atidaryti folinio maišelio 9300-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9300-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9300-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9300-06 – 9300-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

Tiriamas serumas: praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 9300-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9300-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9300-10 nepraskiestame buferyje 9300-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9300-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9300-02, 9300-03, 9300-04 ir 9300-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_3Na). Tirpalas 9300-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9300-05 (0,5 M K_3PO_4) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9300-06 – 9300-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

| | | | Naudojamų šulinėlių skaičius | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 |
| Skiedimo buferis (10 x) | 9300-02 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Plovimo tirpalas (10 x) | 9300-03 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Konjugatas | 9300-09 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Kontrolinis serumas | 9300-06 to -08 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 |
| Tiriamas serumas | Serumas + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| Substrato tirpalas | 9300-10 + 9300-04 | tabl. + ml | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 |

Procedūra:

1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

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

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 µl kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 µl).

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

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

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

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

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

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

5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 15% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9300-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo alveolių echinokokozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9300-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš ***Echinococcus multilocularis*** Em2-Em18 antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9300-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš ***Echinococcus multilocularis*** Em2-Em18 antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

83 % diagnostinis jautrumas nustatytas tikrinant 151 pacientus su alveoline echinokokoze (*Echinococcus multilocularis*). Apytiksliai 84 % šio testo rezultatų (n = 63) cistinei echinokokozei (*E. granulosus*) yra neigiami.

Bandinio specifiškumas buvo testuojamas su serumais pacientų su kitomis parazitozėmis. Rezultatai buvo neigiami 93 % pacientų su kitomis helmintiazėmis (n=46). 98 % neigiamų rezultatų gauta, tikrinant 267 kraujo donorų serumus (šveicarų). Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

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

| | Atsikartojamumas | | Atkuriamumas | |
|---|------------------|-----------|--------------|-----------|
| | Mėginys 1 | Mėginys 2 | Mėginys 1 | Mėginys 2 |
| Vidurkis (absorbcija) | 0.647 | 1.518 | 0.580 | 1.407 |
| Standartinis nuokrypis (absorbcijos) | 0.033 | 0.058 | 0.026 | 0.064 |
| Pokyčio koeficientas (%) | 5.1 | 3.8 | 4.5 | 4.6 |

Literatūros šaltiniai:

Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. **36** : 151-160.

Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S. and Eckert, J. (1993) Improved primary immunodiagnosis of alveolar Echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. J. Clin. Microbiol. **31** : 373-376.

Eckert, J., Conraths, F. and Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int. J. Parasitol. **30** : 1283-1294.

Müller, N., Frei, E., Nuñez, S. and Gottstein, B. (2006) Improved serodiagnosis of alveolar echinococcosis of humans using an in vitro-produced *Echinococcus multilocularis* antigen. Parasitology. **134** : 1-10.

Knapp, J., Sako, Y., Grenouillet, F., Bresson-Hadni, S., Richou, C., Gbaguidi-Haore, H., Ito, A., Millon, L. (2014) Comparison of the serological tests ICT and ELISA for the diagnosis of alveolar echinococcosis in France. Parasite. **21**.



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

