

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus echinokokozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9350
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757

Naudojimo paskirtis:

Serologinei žmogaus cistinės hidatidinės ligos (sukeltos *Echinococcus granulosus*) diagnozei (IgG). Šis tyrimas taip pat gali būti naudojamas serologinei alveolarinės hidatidinės ligos (sukeltos *Echinococcus multilocularis*) diagnozei. Teigiami ir įtartini rezultatai turėtų būti dar kartą patikrinti su specifiniu *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, produktas N° 9300), siekiant nustatyti infekciją sukeliančią *Echinococcus* rūšį.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermenčių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Echinococcus granulosus* hidatidinis skystis 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	9350-01	Laužomos ELISA juostelės su <i>Echinococcus granulosus</i> antigenais (hidatidinis skystis)	96	šulinėliai
DILB	9350-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9350-05	Stabdomas tirpalas (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONTROL -/+	9350-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	μl
CONTROL +	9350-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONJ	9350-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	μl
SUBS	9350-10	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 9350-01 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) 9350-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9350-03 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 9350-06 – 9350-08 190 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 9350-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9350-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9350-10 nepraskiestame buferyje 9350-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9350-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9350-02, 9350-03, 9350-04 ir 9350-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_3Na). Tirpalas 9350-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9350-05 (0,5 M K_3PO_4) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9350-06 – 9350-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Skiedimo buferis (10 x)	9350-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Plovimo tirpalas (10 x)	9350-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugatas	9350-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolinis serumas	9350-06 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	9350-10 + 9350-04	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 < 12% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9350-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo cistinės hidatidinės ligos ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9350-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš ***Echinococcus granulosus*** antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9350-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš ***Echinococcus granulosus*** antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

96 % diagnostinis jautrumas buvo nustatytas testuojant 24 pacientų, turinčių cistinio hidatido ligą (*Echinococcus granulosus*), serumus. Daugumos pacientų (90 %) su alveolarine hidatidine liga (*Echinococcus multilocularis*) rezultatai taip pat buvo teigiami, atliekant šį tyrimą.

Tyrimo specifiškumas buvo testuojamas su serumais iš pacientų su kitomis parazitozėmis. Rezultatai buvo gauti neigiami 82% pacientų su helmintiaze (n=51) ir 83% su protozooze (n=23). Testuojant 150 kraujo donorų serumų (šveicarų) buvo gauta 97 % neigiamų rezultatų. Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Tarp įprasto mėginių kiekio, analizuojamo Europos laboratorijoje, numatoma neigiamų rezultatų reikšmė yra arti 100 %. Priešingai, teigiami rezultatai turi būti patvirtinti visais atvejais naudojant specifiskesnius tyrimo metodus (Em2-Em18 ir ieškant anti-8 Kd antikūnų naudojant imunobloto metodą).

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)	0,525	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

Literatūros šaltiniai:

Gottstein, B. (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. **5** : 248-261.

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.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **60**: 193-198.



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

