

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus filariazei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9400

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755

Naudojimo paskirtis:

Įtariamų klinikinių atvejų tikrinimui ir serologiniams žmogaus filarialinių infekcijų, tokių kaip limfatinė ir Afrikos filariazė (Bankroftinė ir Malajų filariazė, Loaozė, Onchocerkozė ir Mansonelozė) tyrimams (IgG).

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Acanthocheilonema viteae* somatiniais 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	9400-01	Laužomos ELISA juostelės su <i>Acanthocheilonema viteae</i> somatiniais antigenais	96	šulinėliai
DILB	9400-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
WASH	9400-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9400-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9400-05	Stabdomas tirpalas (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONTROL -/+	9400-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	μl
CONTROL +	9400-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONJ	9400-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	μl
SUBS	9400-10	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 9400-01 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) 9400-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

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 fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9400-06 – 9400-08 190 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 9400-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9400-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9400-10 nepraskiestame buferyje 9400-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9400-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9400-02, 9400-03, 9400-04 ir 9400-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_aN₃). Tirpalas 9400-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9400-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9400-06 – 9400-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Skiedimo buferis (10 x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Plovimo tirpalas (10 x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugatas	9400-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolinis serumas	9400-06 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	9400-10 + 9400-04	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 9400-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo filariazės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9400-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš **Acanthocheilonema viteae** somatinius antigenus yra klinikiškai nereikšminga. Jeigu filariazė yra stipriai tikėtina, pacientai turi būti tiriami dėl mikrofilarijos. Neigiama serologija gali būti nustatoma pacientams, sergantiems mikrofilarija.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9400-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš **Acanthocheilonema viteae** somatinius antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Toks rezultatas turi būti interpretuojamas atsižvelgiant į endeminę situaciją ir klinikinius simptomus.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

Žmogaus filariazės testo jautrumas ir specifiškumas yra atitinkamai 95% ir 98 %. Testo rezultatai nesikeičia tarp skirtingų filarialinių infekcijų. Šis testas naudojamas kaip pirmasis tikrinimo metodas. Kryžminis reakingumas gali įvykti su antikūniais kitų parazitų, tokių kaip *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* ir *Echinococcus granulosus*. Teigiami rezultatai turi būti interpretuojami įvertinant endeminę ir klinikinę padėtį.

Rinkinys buvo analizuojamas nepriklausomoje laboratorijoje: iš 22 serumų pacientų, turinčių filariazę (pacientai su mikrofilaremija ir/arba su teigiamu serologiniu testu, atliktu kitomis technikomis, ir epidemiologine ir klinikinėmis filariazės prielaidomis), šiuo metodu 21 serumo rezultatai buvo teigiami. Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikeriniai 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)	0.525	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:

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.



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

