

STRONGYLOIDES RATTI

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus strongiloidozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9450

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/10285

Naudojimo paskirtis:

Bordier *Strongyloides ratti* ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG klasės antikūnų prieš *Strongyloides* žmogaus kraujo serume nustatymui.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos ***Strongyloides ratti*** 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	9450-01	Laužomos ELISA juostelės su <i>Strongyloides ratti</i> somatiniais antigenais	96	šulinėliai
DILB	9450-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
WASH	9450-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9450-05	Stabdomasis tirpalas (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONTROL -/+	9450-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	μl
CONTROL +	9450-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONJ	9450-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	μl
SUBS	9450-10	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 9450-01 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) 9450-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

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.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9450-06 – 9450-08 190 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 9450-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9450-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9450-10 nepraskiestame buferyje 9450-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9450-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9450-02, 9450-03, 9450-04 ir 9450-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_aN₃). Tirpalas 9450-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9450-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9450-06 – 9450-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Skiedimo buferis (10 x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Plovimo tirpalas (10 x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugatas	9450-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolinis serumas	9450-06 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	9450-10 + 9450-04	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 9450-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo strongiloidozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9450-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš **Strongyloides ratti** somatinius antigenus yra klinikiškai nereikšminga. Jei vis tik strongiloidozė yra įtariama, turi būti atlikti kiti tyrimų metodai (Baermano, fekalinių kultūrų, daugkartiniai išmatų tyrimai).

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9450-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš **Strongyloides ratti** somatinius antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Šis rezultatas turėtų būti svarstomas ir vertinamas kartu su kryžminiu reaktyvumu kitų parazitinių infekcijų (nepaminėtų), endemine situacija ir klinikiniais simptomais.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

88 % jautrumas buvo nustatytas testuojant 48 serumus, paimtus iš pacientų, turinčių *Strongyloides stercoralis* lervų.

94 % specifiškumas buvo nustatytas testuojant 100 kraujo donorų (šveicarų) serumų.

Testuojant 89 serumus, paimtus iš 2 grupių pacientų su kitomis parazitozėmis (Amebiaze, Askaridioze, Cisticerkoze, Fascioloze, Filarioze, Cistine echinokokoze, Šistosomoze ir Toksokaroze), nustatytas 77% specifiškumas. 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)	0,738	1,320	0,768	1,339
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0,040	0,040	0,052	0,063
Pokyčio koeficientas (%)	5,5	3,0	6,8	4,7

Literatūros šaltiniai:

Magnaval, J.F., Mansuy, J.M., Villeneuve, L. and Cassaing S. (2000) A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). *European journal of Epidemiology* **16** : 179-182.

Schaffel, R., Nucci, M., Carvalho, E., Braga, M., Almeida, L., Portugal, R. and Pulcheri, W. (2001) The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65** : 346-350.

Loutfy, M. R., Wilson, M., Keystone, J. S. and Kain, K. C. (2002) Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in non endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* : 749-752.

van Doorn, H.R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J.C.F.M., Wismans, P. J., Sarfati, C., Vervoort, T., van Gool, T. (2007) Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 438-442.

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**.



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

