

# FASCIOLA HEPATICA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus fasciolozei nustatyti

96 individualūs testai

Naudojimo instrukcija produktui N° 9650  
EC reg. N°: CH-201504-0006



## Naudojimo paskirtis:

Serologinei žmogaus fasciolozės diagnozei (IgG).

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos **Fasciola hepatica** rekombinantiniais 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):

<b>WELL</b>	9650-01	Laužomos ELISA juostelės su <b>Fasciola hepatica</b> rekombinantiniais antigenais	96	šulinėliai
<b>DILB</b>	9650-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9650-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9650-04	Fermento buferis	50	ml
<b>STOP</b>	9650-05	Stabdomasis tirpalas (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9650-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9650-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9650-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	µl
<b>CONJ</b>	9650-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	µl
<b>SUBS</b>	9650-10	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 9650-01 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) 9650-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

**Plovimo tirpalas:** praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9650-03 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 9650-06 – 9650-08 190 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 9650-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

**Substrato tirpalas:** atšildyti fermento buferį 9650-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9650-10 nepraskiestame buferyje 9650-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

**Stabdomasis tirpalas:** reagentą 9650-05 naudoti neskietą.



**Įspėjimai ir atsargumo priemonės:** Tirpalai 9650-02, 9650-03, 9650-04 ir 9650-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido ( $N_3Na$ ). Tirpalas 9650-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9650-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9650-06 – 9650-08) yra iš triušių.

## Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Skiedimo buferis (10 x)</b>	9650-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Plovimo tirpalas (10 x)</b>	9650-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugatas</b>	9650-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrolinis serumas</b>	9650-06 to -08 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Tiriamas serumas</b>	Serumas + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Substrato tirpalas</b>	9650-10 + 9650-04	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 < 8% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9650-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo fasciolozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9650-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš **Fasciola hepatica** rekombinantiniais somatinius antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9650-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš **Fasciola hepatica** rekombinantiniais antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Tyrimų rezultatai turi būti interpretuojami atsižvelgiant į kryžminį reaktyvumą su kitomis parazitinėmis infekcijomis (paminėtomis žemiau), klinikinius simptomus ir endeminę situaciją.

## Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

**77% jautrumas** buvo nustatytas testuojant 13 pacientų, turinčių fasciolozę, serumus.

**99 % specifiškumas** nustatytas testuojant 99 kraujo donorų serumus (šveicarų).

**98 % specifiškumas** nustatytas testuojant 100 pacientų iš infekcinio skyriaus serumus (šveicarų).

**97% specifiškumą** gautas testuojant 30 pacientų, su kitomis parazitinėmis infekcijomis. Filariozė (0/12), hidatidozė (0/5), Bilharzia (0/1), ir alveolinė echinokokoze (1/12).

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
<b>Vidurkis (absorbcija)</b>	0.459	1.491	0.469	1.547
<b>Standartinis nuokrypis (absorbcijos)</b>	0.023	0.089	0.028	0.069
<b>Pokyčio koeficientas (%)</b>	5.0	6.0	5.9	4.5

## Literatūros šaltiniai:

**Figuroa-Santiago, O., Delgado, B. and Espino, A.M.** (2011) Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70, 355-361.

**Gottstein B, Schneeberger M, Boubaker G, Merkle B, Huber C, et al.** (2014) Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from Fasciola hepatica for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis. PLoS Negl Trop Dis 8(6): e2860. doi:10.1371/journal.pntd.0002860



**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

