

TRICHINELLA SPIRALIS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus trichineliozė nustatyti

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 9750
EC reg. N°: CH-202002-0011



Naudojimo paskirtis:

Bordier Trichinella spiralis ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš *Trichinella spiralis* žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

Kilmė:

Trichineliozė yra pasauliniu mastu paplitusi zoonozė, kurią sukelia kiaulių, arklių ir laukinių gyvūnų parazitiniai nematodai *Trichinella spiralis*. Žmonės gali užsikrėsti valgydami žalią arba nepakankamai šiluminiu būdu apdorotą užkrėstų gyvūnų mėsą. Protrūkiai įvyksta, kai daug žmonių vartoja tą pačią trichinelėmis užkrėstą mėsą. Virškinimo metu lervos išsilaisvina iš cistų ir įsiveržia į plonųjų žarnų gleivinę. Šiame audinyje lervos vystosi į suaugusias kirmėles. Žarnyno liumene patelės veda gyvas lervutes, kurios migruoja į skersaruožius raumenis, kuriuose įsiskverbia į raumenų ląsteles. Dauguma užsikrėtusių žmonių nejaučia jokių simptomų. Tačiau kai kuriais atvejais simptomai pasireiškia ligos pradžioje, kai kirmėlės yra žarnyne (viduriavimas ir pilvo skausmas) ir vėliau, kirmėlės atsiradus raumenyse (raumenų skausmas, karščiavimas, edema). Diagnozė yra pagrįsta požymiais ir simptomais, o taip pat žmogaus kontakto su užkratu istorija ir teigiamais serologinių tyrimų rezultatais.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) lauko metu mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Trichinella spiralis* (E/S) lerviniais antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintos nesurištos konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Trichinella spiralis* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9750-01	Laukomo ELISA juostelės su <i>Trichinella spiralis</i> (E/S) lerviniais antigenais	96	ulinėliai
DILB	9750-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9750-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9750-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9750-05	Stabdomasis tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9750-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9750-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9750-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9750-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9750-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės ono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio mai elio 9750-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9750-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9750-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9750-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 9750-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9750-10 neskiestame fermento buferyje 9750-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9750-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti ūmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar ūemesnėje temperatūroje. Neuū aldykite ir neat ildykite bandinių pakartotinai.

Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N _a N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9750-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	9750-03	0,05 %	/
Fermento buferis	9750-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9750-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	9750-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9750-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9750-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitalioji dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Blokavimas:

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

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

Į kitus tris iš eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 μl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 μl).

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

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 μl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 μl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

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

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 μl plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 μl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

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

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

5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

Jeji reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jeji reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jeji atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 10 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prie orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: www.bordier.ch.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9750-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo trichineliozės ir sveikų žmogaus serumų. Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Trichinella spiralis* E/S antigenus yra kliniškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Trichinella spiralis* E/S antigenus yra laikoma kliniškai reikšminga. Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitu.

Kiekvienoje laboratorijoje gali būti apibrėžta pilkoji zona priklausomai nuo pacientų populiacijos. Jei rezultatai yra tarpiniai ar keliantys abejonių, rekomenduojame pakartotinai atlikti testą po 2-4 savaičių su nauju mėginiu.

Jautrumas ir specifiškumas:

95% jautrumas nustatytas testuojant 55 pacientų serumų su trichinelioze. 98% specifiškumas nustatytas, testuojant 149 kraujo donorų serumų (šveicarų). 90% specifiškumas nustatytas, testuojant 62 paciento serumų su įtariama trichinelioze, tačiau jiems ši diagnozė buvo atmesta. 98% specifiškumas nustatytas, testuojant 100 infekcine liga sergančių pacientų serumų (šveicarų).

Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikeriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Tikslumas:

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

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	0.176	2.052	0.222	2.577
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0.015	0.078	0.015	0.107
Pokyčio koeficientas (%)	8.6	3.8	6.9	4.2

Apribojimai:

93% specifiškumas nustatytas testuojant 44 pacientų serumų su kitomis parazitinėmis infekcijomis. Kryžminis reaktyvumas gali įvykti pacientams su leišmanioze, amebiaze ir anisakidoze.

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

Literatūros altiniai:

Gomez-Morales, M.A., Ludovisi, A., Amati, M., Cherchi, S., Pezzotti, P. and Pozio, E. (2008) Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Trichinellosis. Clin. Vaccine. Immunol. **15**, 1723-1729.

Gottstein, B., Pozio, E. and Nockler, K. (2009) Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control of Trichinellosis. Clin. Microbiol. Rev. **22**, 127-145.

Yong Yang, Ya Nan Cai, Ming Wei Tong, Na Sun, Yin Hua Xuan, Yan Jun Kang, Vallée, I., Boireau, P., Shi peng Cheng and Ming Yuan Liu. (2016) Serological tools for detection of Trichinella infection in animals and humans. One Health **2**, 25-30.



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

