

Taenia solium IgG ELISA

Encimski imunski test za diagnozo cisticerkoze pri ljudeh

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 9700
UDI-DI: 07640158219706



Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Taenia solium* IgG ELISA je namenjen kvalitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti *Taenia solium* v človeškem serumu. Serologija je pomoč pri diagnosticiranju in je ni mogoče uporabiti kot edino diagnostično metodo.

Ozadje:

Cisticerkoza je posledica ličink cisticerk trakulje *Taenia solium*. Ljudje se lahko okužijo z zaužitjem jajčec, prisotnih v kontaminirani hrani ali vodi, ali neposredno s fekalno kontaminacijo rok in hrane/vode s strani bolnika, ki nosi črevesno trakuljo. Cisticerki, ki povzročajo bolezni, okužijo večinoma možgane, mišice, pa tudi druga tkiva. Življenjsko najbolj nevarna lokalizacija so možgani, kar vodi do nevrocisticerkoze. Simptomi so krči in/ali glavoboli, zmedenost, težave z ravnotežjem in otekanje možganov. Diagnoza temelji na tehnikah slikanja, kot so magnetna resonanca ali možganski posnetki računalniške tomografije in pozitivnem rezultatu serološkega testiranja. Bolniki z le enim ali nekaj cisticerk, zlasti če so ti kalcificirani, so razmeroma pogosto seronegativni.

Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z topni antigeni ciste *Taenia solium*. Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost zajedavsko specifičnih protiteles se odkrije s konjugatom proteina A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Taenia solium* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčita z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test je ročni, vendar ga lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, ki jih mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

Material v kompletu (96 testov):

WELL	9700-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z topni antigeni ciste <i>Taenia solium</i>	96	vdolbinic
DILB	9700-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
WASH	9700-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
ENZB	9700-04	Encimski pufer	50	ml
STOP	9700-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9700-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	μl
CONTROL -/+	9700-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	μl
CONTROL +	9700-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	μl
CONJ	9700-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	μl
SUBS	9700-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablete
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet shranjujte med +2°C in +8°C (transport veljaven med -20°C in +37°C 21 dni), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete med +2°C in +8°C.

Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in μl). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na +37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente hranite na temperaturi med +20°C in +30°C vsaj 1 uro in jih pred uporabo premešajte.

Vdolbinice ELISA: odprite stran aluminijaste vrečke 9700-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 9700-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je med +2°C in +8°C stabilen 2 meseca.

Raztopina za pranje: razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 9700-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrom, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je med +2°C in +8°C stabilna 2 meseca.

Kontrolni serumi: razredčite 10 µl kontrolnega seruma 9700-06 do -08 v 190 µl raztopine pufru za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so med +2°C in +8°C stabilni 2 meseca.

Konjugat: razredčite konjugat 9700-09 v raztopini pufru za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

Raztopina substrata: raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 9700-10 v nerazredčenem encimskem pufru 9700-04 (1 tableta v 2,5 ml pufru). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtenek. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

Raztopina za zaustavitev: uporabite nerazredčen reagent 9700-05.

Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti med +2°C in +8°C, če test izvedete v 7 dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju. Vzorce premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufru za redčenje (na primer 5 µl vzorca v 1,0 ml). Ne shranjujte razredčenega vzorca.

Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (NaN_3)	Mertiolat
Pufer za redčenje	9700-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	9700-03	0,05%	/
Encimski pufer	9700-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9700-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9700-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

Komponenta	Nevarna komponenta	Piktogram nevarnosti	Izjava o nevarnosti	Previdnostna izjava
Raztopina za zaustavitev	kalijev fosfat, tribazični		Povzroča hude poškodbe oči	Nositi zaščitne za oči. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (9700-06 do -08) so živalskega izvora (kunci) in z njimi je treba ravnati previdno.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjujte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjujte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu www.bordier.ch.

Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

1. korak: Predinkubacija:

Vdolbinice napolnite z 250 µl raztopine pufru za redčenje.

Inkubirajte 5 do 15 minut med +20°C in +30°C.

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufru za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 8% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 8% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

V primeru, da vzorec oddaja signal, ki presega merilno območje čitalnika mikroplošč, je treba pripisati vrednost, ki ustreza zgornjemu merilnemu območju čitalnika.

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani www.bordier.ch.

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov cisticerkoze in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 9700-07.

Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Taenia solium** klinično nepomembna.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji ali enak **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Taenia solium** klinično pomembna. To pomeni, da je imel bolnik stik s parazitom.

Vsak laboratorij lahko opredeli svojo cono glede na populacijo bolnikov. V primeru mejnih ali dvomljivih rezultatov priporočamo ponovitev testa ponovno po 2-4 tednih s svežim vzorcem.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

Analitične zmogljivosti:

Analitična specifičnost:

Pri 45 serumih bolnikov s cistično ehinokokozo je bila ugotovljena 13-odstotna specifičnost testa. Pri 45 serumih bolnikov s himenolepijo je bila ugotovljena 71-odstotna specifičnost testa.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopolnjenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

Natančnost:

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v dvojniku na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
Povprečje (absorbanca)	0,717	1,358	0,669	1,243
Standardni odklon (absorbanca)	0,045	0,049	0,044	0,088
Koeficient variacije (%)	6,3	3,6	6,6	7,1

Klinične zmogljivosti:

Diagnostična občutljivost:

Pri 45 serumih bolnikov s subarahnoidno nevrocisticerkozo je bila ugotovljena 98-odstotna občutljivost testa. Pri 45 serumih bolnikov z nevrocisticerkozo s samo eno možno cisto je bila ugotovljena 71-odstotna občutljivost testa. Pri 45 serumih bolnikov z nevrocisticerkozo s samo eno kalcificirano cisto je bila ugotovljena 40-odstotna občutljivost testa.

Diagnostična specifičnost:

Pri 99 serumih (švicarskih) krvodajalcev je bila ugotovljena 98-odstotna specifičnost testa. Pri 100 serumih bolnikov iz (švicarske) enote za infektologijo je bila ugotovljena 96-odstotna specifičnost testa.

Pozitivna in negativna napovedna vrednost:

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 94% in NPV 82%.

Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:

Pri zdravi populaciji 99 švicarskih krvodajalcev in 100 serumov iz švicarske enote za infektologijo je pričakovana indeksna vrednost 0,39. Pri prizadeti populaciji 18 serumov bolnikov s cisticerkozo je pričakovana indeksna vrednost 2,24.

Incidenti:

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

Omejitve:

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

Reference:

J.-F. Carod, M.Randrianarison, J. Razafimahefa, R.M. Ramahefarisoa, M. Rakotondrazaka, M. Debruyne, M. Dautigny, P. Cazal, M.L. Andriantseho, E.M. Charles. (2011) Evaluation of the performance of 5 commercialized enzyme immunoassays for the detection of Taenia solium antibodies and for diagnosis of neurocysticercosis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. **72**: 85-89.

S.R.V. Atluri, P. Singhi, N. Khandelwal, N. Malla, (2009) Neurocysticercosis immunodiagnosis using Taenia solium cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. Acta Tropica. **110**: 22-27.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

 Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

 +41 21 566 17 18  cb@bordier.ch  www.bordier.ch

