

Trichinella spiralis IgG ELISA

Imunološko određivanje enzima za dijagnozu ljudske trihineloze

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Upute za upotrebu za br. artikla **9750**
UDI-DI: 07640158219751



Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Trichinella spiralis* IgG ELISA namijenjen je za kvalitativno prepoznavanje antitijela protiv *Trichinella spiralis* u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda.

Pozadina:

Trihinelozu je globalna zoonoza koju uzrokuje *Trichinella spiralis*, parazitska nematoda koja se može pronaći u svinjama, konjima i divljim životinjama. Ljudi se mogu zaraziti konzumacijom sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa zaraženih životinja. Slučajevi izbijanja nastupaju u okolinama u kojima više ljudi konzumira isto meso zaraženo trihinelom. Ličinke se ispuštaju iz cista želučanom izloženošću i prodiru u sluznicu tankog crijeva. U tom se tkivu ličinke razvijaju u odrasle crve. U crijevnom lumenu ženke crva ispuštaju „novorođene ličinke” koje migriraju u prugaste mišiće, gdje prelaze u cistični oblik nakon ulaska u mišićne stanice. Većina zaraženih ljudi ne pokazuje nikakve simptome. Međutim, u pojedinim se slučajevima simptomi pojavljuju tijekom crijevne faze (proljevi i bolovi u trbuhu) i mišićne faze (bolovi u mišićima, vrućica, edem). Dijagnoza se temelji na znakovima i simptomima s poviješću izloženosti i uz pozitivan rezultat dobiven serološkim testiranjem.

Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranih izlučenim/sekretiranim (E/S) antigenima ličinke *Trichinella spiralis*. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Trichinella spiralis* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test je ručni, ali se može provesti automatskim sustavima, koje korisnik mora potvrditi.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	9750-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Trichinella spiralis</i> E/S antigeni	96	jažica
DILB	9750-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
WASH	9750-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
ENZB	9750-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	9750-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9750-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
CONTROL -/+	9750-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
CONTROL +	9750-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
CONJ	9750-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
SUBS	9750-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet između +2°C i +8°C (transport potvrđen između -20°C i +37°C tijekom 21 dana), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i broj serije kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi između +2°C i +8°C.

Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na +37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

Priprema reagensa prije upotrebe:

Sve reagense ostavite na temperaturi između +20°C i +30°C najmanje 1 sat i promiješajte prije upotrebe.

Jažice ELISA: otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9750-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

Pufer za razrjeđivanje: razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9750-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Otopina za ispiranje: razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9750-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Kontrolni serum: razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9750-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Konjugat: razrijedite konjugat 9750-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

Otopina supstrata: otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9750-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9750-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

Otopina za zaustavljanje: upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9750-05.

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum treba čuvati na temperaturi između +2°C i +8°C ako se test izvede unutar 7 dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje.

Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml). Nemojte čuvati razrijeđeni uzorak.

Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (NaN_3)	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9750-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	9750-03	0,05%	/
Enzimski pufer	9750-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9750-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9750-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

Komponenta	Opasna komponenta	Opasnosti piktogram	Oznaka opasnosti	Izjava o mjerama opreza
Otopina za zaustavljanje	kalijev fosfat, trobazni		Uzrokuje teške ozljede oka	Nositi zaštitu za oči. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: Oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje.

- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serum (9750-06 do -08) su životinjskog podrijetla (kunići) i s njima se mora pažljivo rukovati.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense različite broj serije ni kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.

- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu www.bordier.ch.

Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

1. korak: Predinkubacija:

Napunite jažice s 250 µl otopine pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 do 15 minuta između +20°C i +30°C.

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka, preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

5. korak: Mjerenje apsorpcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorpcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorpcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorpcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 10% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 8% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

U slučaju da uzorak daje signal koji prelazi raspon mjerenja čitača mikropločice, treba dodijeliti vrijednost koja odgovara gornjem rasponu mjerenja čitača.

Kontrole kvalitete trenutačnih serija objavljene su na našem web-mjestu www.bordier.ch.

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9750-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva trihineloze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **1,0**. U ovom je slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Trichinella spiralis* klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka veći ili jednak **1,0**. U ovom se slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Trichinella spiralis* smatra klinički značajnom. To označava da je bolesnik bio u dodiru s parazitom.

Svaki laboratorij može definirati sivu zonu u skladu sa svojom bolesničkom populacijom. U slučaju graničnih ili sumnjivih rezultata, preporučujemo ponavljanje testa nakon 2 - 4 tjedna upotrebom svježeg uzorka.

U slučaju sumnjiva rezultata, preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

Analitički rezultati:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 96% pronađena je u 50 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija. Unakrižna reaktivnost poglavito nastupa u bolesnika s lišmeniozom, amebijazom i anisakidozom.

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

Preciznost:

Ponovljivost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma duplikatu u 10 različitim testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjeak (apsorpcija)	0,176	2,052	0,222	2,577
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,015	0,078	0,015	0,119
Koeficijent varijacije (%)	8,6	3,8	7,0	4,6

Klinički rezultati:

Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 95% pronađena je u 20 seruma od bolesnika koji boluju od trihineloze.

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 100% pronađena je u 181 seruma (švicarskih) darivatelja krvi. Specifičnost od 100% pronađena je u 98 seruma od bolesnika (švicarske) infektološke jedinice.

Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 100% i NPV od 99% pronađene su u spomenutim populacijama.

Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 181 švicarskih darivatelja krvi i 98 seruma iz švicarske infektološke jedinice, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,24. U pogođenoj populaciji od 20 seruma od bolesnika koji boluju od trihineloze, očekivana indeksna vrijednost iznosi 3,90.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

Reference:

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 S.A.

 Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

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

