

# Anisakidae IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus virškinimo anisakidozės nustatyti

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



Naudojimo instrukcija produktui N° 9800  
EC reg. N°: CH-202201-0009 - UDI-DI: 07640158219805



## Naudojimo paskirtis:

Bordier *Anisakidae* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prie *Anisakidae* šeimos parazitų kiekybiniam nustatymui žmogaus serume. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

## Kilmė:

Anisakidozė yra pasaulinė helmintinė zoonozė, kurią sukelia kai kurie *Anisakidae* šeimos jūros žuvų nematodai. Žmogus gali užsikrėsti valgydamas žalią arba nepakankamai termiškai apdorotą užterštą žuvis mėsą. Suaugę anisakidų nematodų kirminai gyvena jūrų žinduolių (galutinių šeimininkų) virškinamajame trakte. Užsimezgę vandenyje, kiaušinėliai į vandenį išleidžia užkrėstas L3 lervas, kurias praryja planktoninis vėžys (tarpinis šeimininkas). Suvalgius žuvų ar galvakojų (parateninių šeimininkų), lervos migruoja į vidaus organus ir pilvaplėvės ertmę ir toliau nebesivysto. Jūrų žinduolių nurytos lervos virsta suaugusiais kirminais. Žmogus, atsitiktinis šeimininkas, yra parazitų aklavietė. Dauguma užsikrėtusių žmonių nejaučia jokių simptomų. Tačiau kai kuriais atvejais simptomai pasireiškia skrandžio (epigastrinis skausmas, pykinimas ir vėmimas), žarnyno (pilvo skausmas, pykinimas, vėmimas ir viduriavimas) arba alerginėse stadijose (dilgėlinė, niežulys, angioedema ir bronchų spazmas). Diagnozė grindžiama požymiais ir simptomais, taip pat poveikio istorija ir teigiamu serologinio tyrimo rezultatu.

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) laisvomis mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Anisakidae* išskiriamais/sekretuojamais (E/S) lervų 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 pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Anisakidae* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelių skaitytuvą.

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

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

<b>WELL</b>	9800-01	Laisvos ELISA juostelės su <i>Anisakidae</i> E/S antigenais	96	ulinėliai
<b>DILB</b>	9800-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
<b>WASH</b>	9800-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9800-04	Fermento buferis	50	ml
<b>STOP</b>	9800-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9800-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
<b>CONTROL</b> -/+	9800-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
<b>CONTROL</b> +	9800-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
<b>CONJ</b>	9800-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
<b>SUBS</b>	9800-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	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), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine vieta. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėutės 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 maiytuvas. Laikmatis.

### **Reagentų paruošimas prieš naudojimą:**

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i maišomi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio maišelio 9800-01 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. Į naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

**Skiedimo buferis:** praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9800-02 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) 9800-03 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 9800-06 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 9800-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

**Substrato tirpalas:** ištirpinti fosfatazės substrato tabletes(es) 9800-10 neskiestame fermento buferyje 9800-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. 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.

**Stabdomas tirpalas:** reagentą 9800-05 naudoti neskiestą.

### **Mėginių surinkimas ir paruošimas:**

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai. Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginyje su 1,0 ml).

### **Įspėjimai ir atsargumo priemonės:**

Toksiki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9800-02	0,1%	0,02%
Plovimo tirpalas (10 x)	9800-03	0,05%	/
Fermento buferis	9800-04	0,01%	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9800-06 iki -08	0,1%	0,02%
Konjugatas (50 x)	9800-09	0,1%	/

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

- Stabdomas tirpalas 9800-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9800-06 iki -08) yra iš triušų.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemašyti 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, nekaitalioti dangtelių, kad būtų i vengta užteršimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## 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 ir siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

### 2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėlį (mėginį 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 ulinėlį (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 ulinėlį.

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

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

### 5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

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

## Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 9% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9800-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo anisakidozės ir sveiko 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 **Anisakidae** antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Anisakidae** antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitais.

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.

Jeigu rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

## Analitiniai pasirodymai:

### Analitinis specifiškumas:

81% specifiškumas nustatytas 47 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems toksokaroze, filarioze ir strongiloidoze.

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

### 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)	0,109	1,690	0,121	1,754
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0,011	0,056	0,017	0,102
Pokyčio koeficientas (%)	9,7	3,3	14,2	5,8

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijiškumas

## Klinikiniai pasirodymai:

### Diagnostinis jautrumas:

97% jautrumas buvo nustatytas 38 pacientų serumams, kenčiantiems nuo virškinimo ir (arba) alerginės anisakidozės.

### Diagnostikos specifiškumas:

180 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 97% specifiškumas. 96% specifiškumas buvo nustatytas naudojant 98 gydymo įstaigų infekcijų skyriaus pacientų serumus (Šveicarija). 86% specifiškumas buvo nustatytas 43 serumuose iš pacientų, įtariamų anisakidoze, tačiau kai ši liga buvo užtikrintai atmesta.

### Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 77% PPV ir 99% NPV.

### Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 180 Šveicarijos kraujo donoriai ir 98 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,34. Paveiktoje populiacijoje, kurią sudaro 47 anisakidoze sergančių pacientų serumai, numatoma Indekso vertė yra 3,71.

### Incidentai:

Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

### Apribojimai:

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 šaltiniai:

Mazucco, M., Raia, D.D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F. and Casuccio, A. (2018) Validation of an *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. Plos one 13.

Kochanowski, M., Gonzalez-Munoz, M., Gomez-Morales, M.A., Gottstein, B., Dabrowska, J., Rozycki, M., Cencek, T., Muller, N. and Boubaker, G. (2019) Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG ELISA. Experimental Parasitology 197, 9-15.



**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

