

KASPINUOTIS

1. ĮVADAS

Kaspinuotis yra 2-7 m ilgio kirmėlė, gyvenanti žmonių bei gyvūnų (beždžionių, žiurkių) plonojoje žarnoje ir sukelianti įvairias ligas. Kaspinuočiai gamina proglotidus (mažiau nei 1000, kurių kiekviename yra 50.000 kiaušinėlių), kurie subrendę atsiskiria nuo kaspinuočio ir migruoja į išangę arba yra lieka išmatose. Subrendusių proglotidų kiaušinėliai, esantys išmatose, gali išgyventi nuo mėnesio iki metų. Jiems patekus į gyvo organizmo (kiaulių ir kitų gyvūnų, įskaitant ir žmonių) organizmą, kiaušinėliai išsisklaido, išplinta žarnų sienelėje ir migruoja į skersaruožius raumenis, į smegenis, kepenis ir kitus audinius, kur jie formuojasi į cisterinius darinius. Žmogaus žarnyne, Cisticerkozė išsivysto per 2 mėnesius į kaspinuotį, kuris gali išgyventi iki 25 metų. Parazitinės infekcijos, kurias sukelia kaspinuočio bakterijos, vadinamos cisticerkoze, kuri daro žalą akims ir centrinei nervų sistemai. Kiaulių kaspinuočio bakterijos paplitusios visame pasaulyje. Paplitimas yra didesnis skurdesniuose regionuose, kuriose žmonės valgo netinkamai paruoštą kiaulieną. Musulmonų šalyse tai pasitaiko labai retai. Svarbiausia kaspinuočio ypatybė - cisticerkozės vystymosi rizika.

Rūšis	Liga	Simptomai	Infekcija
Kaspinuotis	Kaspinuočio Cisticerkozė	Cisteriniai dariniai smegenyse gali sukelti padidėjusį kaukolės spaudimą, priepuolius ir protinės būklės pokyčius	Suvalgius netinkamai paruoštos kiaulienos, kurioje buvo kaspinuočio kiaušinėlių, taip pat per išmatas ar vandenį

Infekcija gali būti nustatyta šiais būdais:

- Mikroskopija: kiaušinėlių ir proglotidų išmatose nustatymas (kaspinuočio kiaušinėliai nėra morfologiškai lengvai atskiriami nuo Echinococcus ir Multiceps kiaušinėlių)
- Serologiją: antikūnų aptikimas ELISA pagalba

Cisticerkozės diagnozė nustatoma panaudojus keletą metodų, pavyzdžiui, rentgenografijos ir serologinį metodus.

2. PASKIRTIS

NovaTec Taenia solium IgG ELISA tyrimas skirtas kokybiškai nustatyti IgG klasės antikūnams prieš kaspinuočio bakterijas žmogaus serume ar plazmoje (citrato pavidalu).

3. TYRIMO PRINCIPAS

Kokybinis imunoenzimatinis IgG klasės antikūnų prieš kaspinuočio bakterijas nustatymas pagrįstas ELISA metodu.

Mikrotitravimo juostelės šulinėliai yra padengti kaspinuočio antigenais, sujungiančiais reikiamus mėginio antikūnus. Prieš plaunant šulinėlius, reikia pašalinti visus laisvus krienų peroksidazės (HRP) mėginius ženklinančius baltymo A junginius. Šie junginiai jungiasi į antigeno-antikūnų kompleksus. Imuninis kompleksas, susiformavęs dėl įvykusios susijungimo, yra matomas pridėjant Tetrametrobendridino (TMB) substratą, kuris reakcijos produktui suteikia mėlyną spalvą.

„Genomas“
*
Eglė J. Kaušlytė
Direktorius pavaduotoja

Šio produkto intensyvumas yra proporcingas *Taenia solium* specifinių IgG antikūnų kiekiui mėginyje. Siekiant sustabdyti reakciją yra pridėjama Sieros rūgšties. Baigiamoji spalva yra geltona. Absorbicija esant 450 nm skaitoma naudojant ELISA mikrošulinėlių lėkštelės skaitytuvą.

4. MEDŽIAGOS

4.1. Reagentai

- **Taenia solium padengti šulinėliai (IgG):** 12 turinčių po 8-šulinėlius nuimamų juostelių, padengtų *Taenia solium* antigenais; uždaromų aliuminio folija.
- **IgG mėginių skiediklis***:** 1 buteliukas, kuriame yra 100 ml mėginio skiedimo buferio pH $7,2 \pm 0,2$; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; baltu dangteliu.
- **Sustabdymo tirpalas:** 1 buteliukas, kuriame yra 15 ml sieros rūgšties 0,2 mol / l; paruoštas naudoti; raudonu dangteliu.
- **Plovimo tirpalas (20x konc.):** 1 buteliukas, kuriame yra 50 ml 20 kartų koncentruotas buferinis tirpalas (pH $7,2 \pm 0,2$) šulinėliams plauti; baltu dangteliu.
- **Baltymo A konjugatas**:** 1 buteliukas, kuriame yra 20 ml peroksiduoto baltymo A; mėlynos spalvos, paruoštas naudoti; juodu dangteliu.
- **TMB substrato tirpalas:** 1 buteliukas, kuriame yra 15 ml 3,3', 5,5'-tetrametrobendzidino (TMB), paruoštas naudojimui, geltonu dangteliu.
- **Taenia solium IgG teigiama kontrolė***:** 1 buteliukas, kuriame yra 2 ml; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; raudonu dangteliu.
- **Taenia solium IgG užbaigimo kontrolė***:** 1 butelyje yra 3 ml, geltonos spalvos, paruoštas naudoti; žaliu dangteliu.
- **Taenia solium IgG neigiama kontrolė***:** 1 buteliukas, kuriame yra 2 ml; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; mėlynu dangteliu.
 - * Yra 0,1% Bronidox L praskiedus
 - ** Yra 0,2% Bronidox L
 - *** Yra 0,1% Kathon

4.2 pateiktos medžiagos

- 1 juostelės laikiklis
- 1 viršelio folija
- 1 tyrimo protokolas
- 1 paskirstymo ir identifikavimo planas

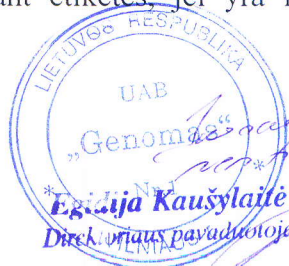
4.3. Medžiagos ir įranga, reikalinga

- ELISA mikro šulinėlių lėkštelės skaitytuvas, įrengtas 450/620nm absorbcijos matavimas
- Inkubatorius 37 °C
- Rankinė arba automatinė įranga šulinėliams skalauti
- Pipetės, talpinančios nuo 10 iki 1000 µl
- Sūkurinis tūbelių maišytuvas
- Dejonizuotas arba šviežiai distiliuotas vanduo
- Vienkartinės tūbelės
- Laikmatis

5. STABILUMAS IR SANDĖLIAVIMAS

Reagentai išlieka tinkami naudoti iki laiko, nurodyto ant etiketės, jei yra laikomi 2 ... 8 ° C temperatūroje.

6. REAGENTO PARUOŠIMAS



Labai svarbu prieš pradedant bandymą visus reagentų mėginius ir kontrolines medžiagas palaikyti kambario temperatūroje (20 ... 25 ° C)!

6.1. Dengtos nuimamos juostelės

Paruoštos naudoti juostelės, padengtos Taenia solium antigenų. Juosteles laikyti 2 ... 8 °C temperatūroje. Atskyrus juosteles, likusios juostelės iš karto turi būti pakartotinai užsandarintos aliuminio folija kartu su desikantu ir laikomos 2 ... 8 °C temperatūroje iki jų panaudojimo. Jos tinkamos naudoti iki nurodytos galiojimo datos.

6.2. Baltymo A konjugatas

Butelyje yra 20 ml baltymo A tirpalo, krienų peroksidazės, buferio, stabilizatorių, konservantų ir inertinių mėlynų dažų. Tirpalas yra paruoštas naudoti, jį laikyti 2 ... 8 °C temperatūroje. Po pirmojo atidarymo yra tinkami naudoti iki nurodytos galiojimo datos, laikant 2 ... 8 °C temperatūroje.

6.3. Kontrolė

Buteliukuose, ženklinamuose etiketėmis „teigiama“, „nutraukti“ ir „neigiama“ kontrolės, yra paruošti naudoti tirpalai. Juose yra 0,1% Katono, jie turi būti laikomi 2 ... 8 °C temperatūroje. Po pirmojo atidarymo galima naudoti iki nurodytos galiojimo datos, laikant 2 ... 8 °C.

6.4. IgG Mėginių skiediklis

Butelyje yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatorių, konservantų ir inertinių geltonos spalvos dažų. Jis vartojamas praskiesti paciento mėginiui. Šis paruoštas naudoti tirpalas turi būti laikomas 2 ... 8 °C temperatūroje. Po pirmojo atidarymo tinkamas iki nurodytos galiojimo datos, laikant 2 ... 8 °C.

6.5. Plovimo tirpalas (20x konc.)

Butelyje yra 50 ml koncentruoto buferio, ploviklio ir konservantų. Plovimui skiesti dalimis 1:19; pvz. 10 ml plovimo tirpalo su 190 ml šviežio ir be mikrobų perdistiliuoto vandens. Skiestas buferinis tirpalas yra tinkamas naudoti 5 dienas, laikant kambario temperatūroje. Kristalai ištirpsta pašildžius tirpalą iki 37 °C vandens vonioje. Po pirmo atidarymo koncentratas yra tinkamas naudoti iki nurodytos datos.

6.6. TMB Substrato tirpalas

Butelyje yra 15 ml tetraetilobenzidino / vandenilio peroksido sistemos. Reagentas yra paruoštas naudoti ir turi būti laikomas tamsoje, 2 ... 8 °C temperatūroje. Tirpalas turi būti bespalvis arba gali turėti šiek tiek mėlynos spalvos atspalvio. Jei substratas virsta mėlyna, jis gali užsikrėsti ir dėl to turi būti išmestas. Po pirmojo atidarymo yra tinkamas naudoti iki nurodytos datos, laikant 2 ... 8 °C.

6.7. Sustabdymo tirpalas

Butelyje yra 15 ml 0,2 M sieros rūgšties tirpalo (R 36/38, S 26). Jis yra paruoštas naudoti ir turi būti laikomas 2 ... 8 °C temperatūroje. Po pirmojo atidarymo yra tinkamas naudoti iki nurodytos galiojimo datos.

7. MĖGINIŲ ĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

Šiam tyrimui reikia naudoti žmogaus serumo ar plazmos (citrato) mėginius. Jei testas atliekamas per 5 dienas po mėginių surinkimo, mėginiai turi būti laikomi 2 ... 8 °C, priešingu atveju jie turėtų būti pakartoti ir saugomi sušaldyti (-70 ... -20 °C). Jei mėginiai yra saugomi sušaldyti, prieš bandymą gerai sumaišykite atšildytus mėginius. Venkite pakartotinio užšaldymo ir atšildymo. Nerekomenduojama Nerekomenduojamas mėginiams šilumos inaktyvavimas.



7.1. Mėginį atskiedus

Prieš tyrimą visi mėginiai turi būti atskiesti dalimis 1:100 su IgG mėginių skiedikliu. Paruošiama po 10µl mėginio ir 1 ml IgG mėginių skiediklio mėginėliuose santykiu 1:100, jie kruopščiai suplakami su "Vortex".

8. ANALIZĖS TVARKA

8.1. Pasirengimas bandymui

Prašome atidžiai perskaityti bandymo protokolą prieš atliekant testą. Rezultatų patikimumas priklauso nuo griežto protokole aprašytos bandymo tvarkos laikymosi. Žemiau pateikta tvarka yra galima tik šiai procedūrai. Jei vykdomas ELISA automatinių sistemų bandymas, rekomenduojama plovimo veiksmus padidinti nuo trijų iki penkių kartų ir plovimo tirpalo turį nuo 300µl 350µl, kad būtų išvengta plovimo efekto. Prieš pradėdant testą, visų egzempliorių ir kontrolės paskirstymo ir identifikavimo planas turi būti kruopščiai peržiūrimas rinkinio rezultatų lape. Pasirinkite reikiamą skaičių mikrotitravimo juostelių arba šulinėlių ir įdėkite juos į laikiklį.

Prašome paskirstyti ne mažiau kaip:

- 1 šulinėlį švaraus substrato (pvz., A1),
- 1 šulinėlį neigiamos kontrolės (pvz., B1),
- 2 šulinėlius ribinės kontrolės (pvz., C1 + D1),
- 1 šulinėlį teigiamos kontrolės (pvz., E1).

Rekomenduojama nustatyti kontrolės ir paciento mėginius dviem egzemplioriais.

Atlikite visus veiksmus eilės tvarka ir be jokio vėlavimo tarp kiekvieno veiksmo.

Kiekvienam kontrolės ir mėginio pilstymui turi būti naudojamas švarus, vienkartinis antgalis.

Sureguliuokite inkubatorių $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ temperatūroje.

1. Paskirstykite 100µl kontrolės ir atskieskite mėginius jų šulinėliuose. Palikite šulinėlį A1 švariam substratui.
2. Uždenkite šulinėlius folija, kuri yra rinkinyje.
3. **Inkubuokite 1 valandą \pm 5 min esant $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$.**
4. Kai inkubacija baigta, pašalinkite foliją, ištraukite šulinėlių turinį ir išplaukite kiekvieną šulinėlį tris kartus su 300µl plovimo tirpalo. Venkite reakcijos šulinėlių perpildymo. Laikas tarp kiekvieno plovimo ciklo $> 5\text{s}$. Pabaigoje atsargiai ištraukite likusį skystį, nusauskite popieriaus juostelėmis prieš pradėdami kitą etapą!

Pastaba: plovimas yra labai svarbus! Netinkamas plovimas padidina absorbcijos vertes.

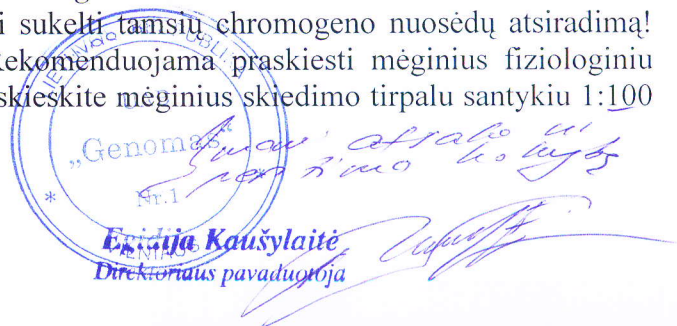
5. Paskirstykite 100µl baltymo A konjugato į visus šulinėlius, išskyrus švaraus substarto (pvz., A1). Uždenkite folija.

6. Inkubuokite 30 min kambario temperatūroje. Saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.

7. Pakartokite 4 žingsnį.
8. Paskirstykite 100µl TMB substrato tirpalo į visas duobutes.
9. Inkubuokite lygiai 15 min kambario temperatūroje tamsoje.
10. Paskirstykite 100µl sustabdymo tirpalo į visus šulinėlius ir viską atlikite ta pačia tvarka kaip su TMB substrato tirpalu.

Bet kokia mėlyna spalva, sukurta inkubacijos metu, virsta geltona.

Pastaba: aukšto teigiamumo paciento mėginiai gali sukelti tamsių chromogeno nuosėdų atsiradimą! Šios nuosėdos turi įtaką vertinant optinį tankį. Rekomenduojama praskiesti mėginius fiziologiniu natrio chloridu pavyzdžiui, santykiu 1:1. Tuomet atskieskite mėginius skiedimo tirpalu santykiu 1:100 ir padauginkite rezultatus į NTU 2.



11. Išmatuokite absorbuojamus mėginius 450/620nm per 30 min, po to sustabdykite pabaigos tirpalu..

8.2. Matavimas

Nustatykite ELISA mikro šulinėlių lėkštelės skaitytuvą **iki nulio** naudodami švarų substratą A1.

Jeigu dėl kokių nors techninių priežasčių ELISA skaitytuvas negali būti nustatytas iki nulio naudojant švarų substratą šulinėlyje A1, atimkite absorbcijos vertę iš šulinėlio A1 iš visų kitų absorbcijos verčių, išmatuotų siekiant gauti patikimus rezultatus!

Išmatuokite visų šulinėlių absorbciją esant 450 nm bangos ilgiui ir užrašykite kiekvienos kontrolės ir paciento mėginių absorbcijos reikšmes platinimo ir identifikavimo plane.

Rekomenduojama dvejopas bangos ilgio skaitymas, naudojant 620 nm.

Apskaičiuokite vidutines visų kartotinių absorbuojamųjų vertes.

9. REZULTATAI

9.1. Vykdyti patvirtinimo kriterijus

Kiekybinė analizė turi būti laikoma galiojančia, jei bus laikomasi šių kriterijų:

Substraktas tuščio bandynio	A1	absorbcijos vertė < 0,100.
Neigiama kontrolė	B1	absorbcijos vertė < 0,200 ir < nukirpimas (cut-off)
Nukirpimo kontrolė	C1 ir D1	absorbcijos vertė 0,150 – 1,30.
Teigiama kontrolė	E1	absorbcijos vertė > nukirpimas.

Jei šių kriterijų nėra, bandymas yra negaliojantis ir jį reikia pakartoti.

9.2. Rezultatų apskaičiavimas

Ribinė vidutinė absorbcijos vertė nukirpio kontrolės nustatymo.

Pavyzdys: Absorbcijos vertė nukirpimo kontrolės 0,39+ absorbcijos vertė nukirpimo kontrolės 0,37=0,76/2=0,38

Nukirpimas=0,38.

9.3 Rezultatų interpretavimas

Mėginiai yra laikomi teigiamais jei absorbcijos vertė yra didesnė daugiau kaip 10% už nukirpimo kontrolės vertę. Mėginiai, kurių absorbcijos vertė 10% didesnė arba mažesnė už nukirpimo kontrolės vertę neturėtų būti laikomi akivaizdžiai teigiamais arba neigiamais → pilkoji zona

Tada rekomenduojama atlikti bandymą po 2-4 savaičių su kitu mėginiu. Jei rezultatai vėl pakliūs į pilkąją zoną, tada reikia jį laikyti neigiamu.

Mėginiai turi būti laikomi neigiamais, jei absorbcijos vertė yra mažesnė nei 10 %, palyginus su nukirpimo kontrole.

9.3.1. Rezultatai NovaTec vienetais

(Paciento (vidurkis) absorbcijos vertė x 10)/nukirpimo kontrolės=(NovaTec vienetai=NTU)

Pavyzdys: 1,204x10/0,38=32 NTU (NovaTec vienetai)

Nukirpimo kontrolė 10 NTU

Pilkoji zona 9-11 NTU

Neigiama < 9 NTU

Teigiama > 11 NTU



10. Specifinės veikimo savybės

10.1. Tikslumas

Interassay	n	Mean (NTU)	Cv (%)
Pos. Serum	5	0.8	4.4
Intraassay	n	Mean (E)	Cv (%)
Pos. Serum	8	1.31	6.6

10.2. Diagnostinis specifiskumas

Diagnostinis specifiskumas apibrėžiamas kaip tikimybė, jog testas bus neigiamas, jei bandinyje nėra specifinio analizuojamo objekto.

Tai yra > 95 %.

10.3. Diagnostinis jautrumas

Diagnostinis jautris apibrėžiamas kaip tikimybė, jog testas bus teigiamas, jei bandinyje yra specifinis analizuojamas objektas. Tai yra 93,8 %.

10.4. Trugdžiai

Trugdžiai su lipemišku ar istericu serumu nėra pastebėti iki 10 mg/ml hemoglobino koncentracijos ir 5 mg/ml trigliceridų, bei 0,2mg/ml bilirubino. Rezultatai pateikiami ištirtų mėginių grupėms; tai nearantuota specifikacijoje.

11. Procedūros aprašymai

Bakterinis užterštumas ar pakartotinis užšaldymas-atšildymas gali turėti įtakos absorbcijos vertei. Diagnozuoti infekcinę ligą negalima iš vieno atlikto bandymo.

Pacientams su susilpnėjusiu imunitetu ir naujagimiams serologiniai duomenys turi ribotą vertę.

Galima kryžminė reakcija su Echinococcus antikūniais ir Entamoeba antikūniais prieš antikūnius.

Jei Echinococcus ir Entamoeba infekcija yra, tada negalima atmesti nustatytos diferencinės diagnozės, tada teigiamas mėginys turėtų būti patvirtintas remiantis kita metodika.

12. Atsargumo priemonės ir perspėjimai

- Remiantis spraisnio 1 dalies 2b Europos direktyvos 98/79/EB in vitro diagnostikos medicinių prietaisų tinkamumas, kokybė bei saugumas yra užtikrinami gamintojo. Todėl būtina griežtai laikytis testų atlikimo procedūrų, atsargumo priemonių ir įspėjimų, nurodytų naudojimosi instrukcijoje. Visas technikos, analizatorių ir panašios įrangos naudojimas turi būti patvirtintas. Bet koks dizaino, sudėties ir bandymo procedūros, taip pat visi kitokie pakeitimai ar panaudijimai kitokių produktų, kurie nėra patvirtinti gamintojo yra draudžiami ir pats vartotojas tampa atsakingas už bet kokius pakeitimus.
- Naudojama tik in-vitro diagnostikoje
- Visi žmogiškosios kilmės komponentai esantys kaip sudedamosios dalys reagentuose buvo ištirti dėl ŽIV antikūnių, anti-HCV antikūnių ir HBsAg ir jų nebuvo rasta. Nepaisant to visos medžiagos turėtų būti laikomos ir tvarkomos kaip potencialūs užkratai.
- Negalima maišyti juostelių ir reagentų iš skirtingų gamybos partijų.
- Negalima naudoti jokių kitų gamintojų reagentų kartu su šiais.
- Nenaudoti pasibaigus tinkamumo laikui.
- Naudoti tik švarias pipetes, dozatorius ir laboratorinius įrankius.
- Negalima sukeisti užsukamų dangtelių ant buteliukų vietomis.
- Po panaudojimo buteliukus reikia iš karto uždaryti, kad nepatektų mikrobus ir nenugaruotų.
- Po pirmojo atidarymo vėlesniam panaudojimui patrinkinkite konjugatą ir kontrolės buteliukus nuo mikrobino užterštumo.

Genomika
Egidija Kaušlytė
Direktorius pavaduotoja
VILNIAUS

- Kad būtų išvengta kryžminio užterštumo ir klaidingai padidėjusių rezultatų, reikia su pipete paciento mėginius ir konjugatą išpilti be pusrų tiesiai į šulnelių dugną.
- Tyrimas skirtas atlikti tik kvalifikuotoms darbuotojams.

Perspėjimas: Naudojant koncentratą Bronidox L reikia būti atsargiems, nes patekęs ant odos ar gleivinės yra labia toksiškas.

Sieros rūgštis dirgina akis ir odą. Laikyti vaikams nepasiekamoje vietoje. Patekus į akis, jas gerai praplauti su vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

12.1. Atliekų tvarkymas

Cheminių medžiagų likučiai yra laikomi pavojingomis atliekomis. Pavojingas atliekas reikia tvarkyti remiantis nustatytais vietos įstatymais.

13. Užsakymo Informacija

Užsakymo Nr.: TAEG0420 Taenia solium IgG-ELISA (96 tyrimai)

