

NovaLisa™

Trichinella spiralis

IgG –ELISA

Fermentinis imunologinis tyrimas skirtas kokybiniam ir pusiau kiekybiniam trichineliozės nustatymui žmogaus kraujo serume ar plazmoje.

Naudojama tik in vitro diagnostikoje.

1. Įvadas

Trichineliozę sukelia *Trichinella* genties nematodai (apvalios kirmėlės). Taip pat atpažįstami: paprastas *Trichinella spiralis*, kuris aptinkamas mėseėdžiuose ir visaėdžiuose gyvūnuose visame pasaulyje, bei keturios kitos rūšys: *T. pseudospiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, and *T. britovi*. Trichinelioze susergama suvalgant mėsą, kurioje būna cistos. Cistos paveikiamos skrandžio rūgštimi ir pepsinu, tada nuo jų poveikio lervos išsilaisvina iš cistos ir įsiveržia į plonosios žarnos gleivinę, kur vystosi iki suaugusio kirminio (patelės iki 2,2 mm ilgio, o patinai iki 1,2 mm ilgio). Po vienos savaitės petelės išleidžia lervas, kurios migruoja į skersaruožius raumenis, kur jos užsidaro į cistas. Lervos kalkejimo etapas trunka nuo 4 iki 5 savaičių ir užsidariusios į cistą lervos gali likti gyvbingos keletą metų. Trichineliozės infekcija išplitusi visame pasaulyje, tačiau yra labiausiai paplitusi Europoje ir Jungtinėse Amerikos Valstijose. Ši infekcija gali neturėti jokių simptomų. Lengvos arba vidutinio sunkumo infekcijos simptomai išnyksta per kelias savaites, o tuo tarpu nuovargis, silpnumas ir viduriavimas gali užtrukti keliatą mėnesių. Labai sunkiais atvejais gali būti ir mirčių.

| Rūšis | Liga | Simptomai | Kaip užsikrečiama |
|-----------------------------|---------------|-----------------------------|--|
| <i>Trichinella spiralis</i> | Trichineliozė | Pykinimas, viduriavimas, | Infekcija galima užsikrėsti tik valgant |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | vėmimas, nuovargis, karščiavimas ir pilvo diskomfortas. Lervų migracija į raumeninį audinį gali sukelti edemą, konjungtyvitą, raumenų skausmą, kraujosruvas, išbėrimus ir kraujo eozinofiliją. | žalią ar gerai neišvirtą kiaulieną ir laukinių sumedžiotų gyvūnų mėsą, kurie užsikrėtę Trichineliozės kirminais. |
|--|--|--|--|

Infekciją galima nustatyti:

Per mikroskopą, naudojant raumenų biopsiją.

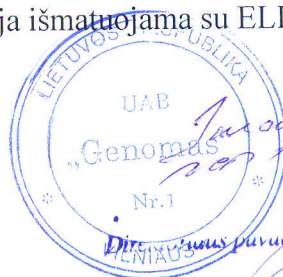
Serologiškai: Antikūnių aptikimas ELISA metodu.

2. Paskirtis

NovaTec Trichinella spiralis IgG ELISA tyrimas yra skirtas kokybiniam ir pusiau kiekybiniam nustatymui IgG klasės antikūnams Trichinella spiralis žmogaus serume arba plazmoje (citrato pavidalu).

3. Testo principas

Kokybinis imunoenzyminis testas nustatantis antikūnius nuo Trichinella spiralis sukėlėjo pagrįstas ELISA metodu. Mikrotitravimo juostelės šulineliai padengti su Trichinella spiralis ES-antigenais (ekskreciniais/sekreciniais antigenais) prisijungia atitinkamus antikūnius iš bandynio. Po plovimo iš duobučių pašalinus bandynio likučius įdedama krienų peroksidazės (HRP) paženklinto Baltymo A konjugato. Šis konjugatas jungiasi prie prilipusių Trichinella spiralis specifinių antikūnių. Imuninis kompleksas, suformuotas pridėjus konjugato, vizualizuojamas pridėdam tetrametilbenzidino (TKK) substrakto, kuris suteikia mėlyną reakcijos produktą. Šio produkto intensyvumas yra proporcingas Trichinella spiralis specifinių antikūnių kiekiui bandinyje. Reakcija sustabdoma pridėdam sieros rūgšties. Tai suteikia galutinę geltoną spalvą. Absorbcija išmatuojama su ELISA microwell plokštelių skaitytuvu nustačius 450 nm bangos ilgį.



4. Medžiagos

4.1 Pridėti reagentai

- Trichinella spiralis padengti šulinėliai: 12 juostelių po 8 šulinėlius padengtų Trichinella spiralis antigenų, uždarytų aliuminio folija;
- IgG mėginių skiediklis***: 2 buteliukai po 50 ml mėginio skiedimo buferio; pH 7,2 ± 0,2; spalva geltona; paruošta naudoti; baltas dangtelis.
- Sustabdymo tirpalas: 1 buteliukas, kuriame yra 15 ml sieros rūgšties 0,2 mol/l; paruoštas naudoti; raudonas dangtelis.
- Plovimo tirpalas (20xkonc.): 1 buteliukas, kuriame yra 50 ml 20 kartų koncentruotas buferinis tirpalas (pH 7,2 ± 0,2) skirtas šulineliams plauti; baltas dangtelis.
- Trichinella spiralis baltymo A konjugatas**: 1 buteliukas, kuriame yra 20 ml peroksidazės baltymo A; mėlynos spalvos; paruoštas naudojimui; juodas dangtelis.
- TKK substrato tirpala: 1 buteliukas, kuriame yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TKK); paruoštas naudoti; geltonas dangtelis.
- Trichinella spiralis teigiama kontrolė***: 1 buteliukas, kuriame yra 2 ml; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; raudonas dangtelis.
- Trichinella spiralis nukirpimo kontrolė***: 1 buteliukas, kuriame yra 3 ml; geltona spalva; paruoštas naudoti; žalias dangtelis.
- Trichinella spiralis neigiama kontrolė***: 1 buteliukas, kuriame yra 2 ml; geltona spalva; paruoštas naudoti; mėlynas dangtelis.

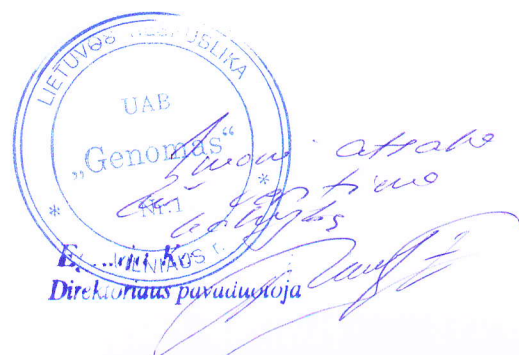
* po praskiedimo yra 0,1 % Bronidox L

** yra 0,2 % Bronidox L

*** yra 0,1 % Kathon

4.2. Pateiktos medžiagos

- 1 juostelių laikiklis
- 1 folijos viršelė
- 1 tyrimo protokolas
- 1 paskirstymo ir identifikavimo planas



4.3 Reikalingos medžiagos ir įranga

- ELISA microwell plokštelių skaitytuvas, nustatytas matuoti nuo 450 iki 620 nm absorbcijai.
- Inkubatorius prie 37 °C
- Rankinė arba automatinė įranga šulinelių skalavimui
- Pipetės, skirtos skysčiui nuo 10 iki 1000 µl
- Sukūrinis mėginių maišytuvas
- Dejonizuotas arba (šviežiai) distiliuotas vanduo
- Vinkartiniai mėgintuvėliai
- Laikmatis

5. Stabilumas ir laikymas

Reagentai išlieka stabilūs ir tinkami naudoti, kol nesibaigęs galiojimo laikas, kuris nurodytas etiketės, taip pat reikia laikyti 2...8 °C.

6. Reagentų paruošimas

Labai svarbu prieš atliekant bandymą visus reagentų mėginius ir kontrolines medžiagas atšildyti iki kambario temperatūros (20 iki 25 °C).

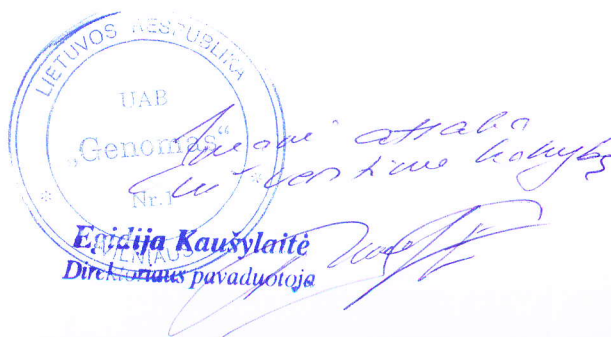
6.1. Dengtos šulinelių juostelės

Paruoštos naudoti šulinelių juostelės yra padengtos *Trichinella spiralis* antigenų. Laikyti reikia nuo 2 iki 8 °C temperatūroje. Iš karto nuėmus juosteles, likusios juostelės turėtų būti laikomos susuktos į aliuminio foliją kartu su džiovikliu ir laikomos nuo 2 iki 8 °C, stabilumas išlieka iki galiojimo laiko pabaigos.

6.2. *Trichinella spiralis* baltymo A konjugatas.

Butelyje yra 20 ml tirpalo su baltymu A, krienų peroksidazės, buferio, konservantų ir mėlynų dažų. Baltymas A yra imunoglobuliną Fc surišantis baltymas, kurio molekulinis svoris 42,000 Daltonų. Tirpalas yra paruoštas naudoti. Laikoma nuo 2 iki 8 °C. Po pirmojo atidarymo stabilus išlieka iki galiojimo laiko pabaigos, jei laikoma nuo 2 iki 8 °C.

6.3. Kontrolė



Buteliukai pažymėti etiketėmis: teigiama kontrolė, nukirpimo kontrolė ir neigiama kontrolė yra paruošti naudoti. Jie turi būti laikomi nuo 2 iki 8 °C. Po pirmojo atidarymo stabilus išlieka iki galiojimo laiko pabaigos, jei laikoma nuo 2 iki 8 °C.

6.4. IgG mėginių skiediklis

Butelyje yra 50 ml fosfatinio tirpalo, stabilizatorių, konservantų ir inertinių geltonos spalvos dažų. Jis naudojamas paciento mėginio praskiedimui. Paruoštas naudoti. Laikoma nuo 2 iki 8 °C. Po pirmojo atidarymo stabilus išlieka iki galiojimo laiko pabaigos, jei laikoma nuo 2 iki 8 °C.

6.5. Plovimo tirpalas (20x konc.)

Butelyje yra 50 ml koncentruoto buferio, ploviklių, konservantų. Skiesti plovimo tirpalą 1+19; pvz. 10 ml plovimo tirpalo ir 190 ml šviežio ir be mikrobų perdistiliuoto vandens. 5 dienas galima praskiestą tirpalą laikyti kambario temperatūroje. Kristalai esantys tirpale išnyksta pašildžius iki 37 °C vandens vonelėje. Po pirmo atidarymo koncentratas išlieka stabilus iki galiojimo datos pabaigos.

6.6. TMT substrakto tirpalas

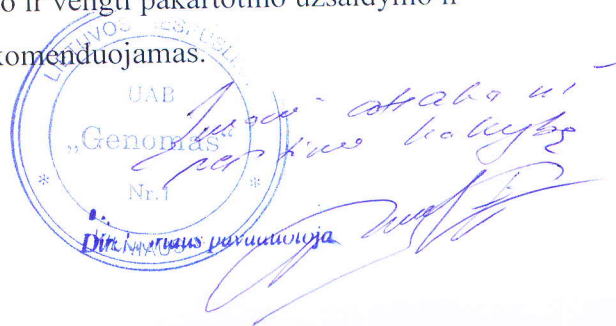
Butelyje yra 15 ml tetrametilbenzidino/vandenilio peroksido. Reagentai yra paruošti naudoti. Reagentus reikia laikyti tamsoje, prie 2...8 °C. Tirpalas yra bespalvis arba šiek tiek mėlino atspalvio. Jei substraktas pavirsta mėlynu, jis gali būti užkrėstas ir turi būti išpiltas. Po pirmojo atidarymo stabilus išlieka iki galiojimo laiko pabaigos, jei laikoma nuo 2 iki 8 °C.

6.7. Sustabdymo tirpalas

Butelyje yra 15 ml 0,2 M sieros rūgšties tirpalo (R 36/38, S 26). Tirpalas paruoštas naudoti. Laikoma nuo 2 iki 8 °C. Po pirmojo atidarymo stabilus išlieka iki galiojimo laiko pabaigos, jei laikoma nuo 2 iki 8 °C.

7. Mėginių paėmimas ir paruošimas

Šiam testui naudojami žmogaus serumo ar plazmos (citrato forma) mėginiai. Jei testas atliekamas per 5 dienas nuo mėginio paėmimo, tai mėginius reikia laikyti 2...8 °C. Priešingu atveju jie turėtų būti laikomi atšaldyti nuo -20 iki -70 °C. Jei mėginiai buvo sušaldyti, atšildžius juos reikia sumaišyti prieš atliekant bandymą. Nešildyti nukenksminto serumo ir vengti pakartotino užšaldymo ir atšildymo. Šiluminis nukenksminimas mėginiams nerekomenduojamas.



7.1. Mėginių praskiedimas

Prieš tyimą visus mėginius reikia praskiesti 1 + 100 su IgG mėginių skiedikliu. Paruošiama 10 µl mėginio ir 1 ml IgG mėginio skiediklio mėgintuvėlyje, gaunama 1 + 100 skiedinio ir kruopščiai sumaišoma su Vortex.

8. Procedūros atlikimas

8.1. Pasirengimas testui

Prieš atliekant tyrimą reikia atidžiai perskaityti instrukciją. Rezultato patikimumas griežtai priklauso nuo testo atlikimo tvarkos. Šio testo atlikimo rezultatus turi patvirtinti vadovas. Jei ELIZA testą atlieka automatinė sistema rekomenduojama plovimą padidinti nuo 3 iki 5 kartų ir plovimo tirpalo tūrį nuo 300 µl iki 350 µl, kad išvengtų plovimo efektų. Prieš pradėdant tyrimą, platinimo ir identifikavimo planas visiems egzemplioriams ir kontrolėms turi būti atidžiai nustatytas rezultatų lape, kuris pateikamas rinkinyje. Parinkite reikiamą skaičių mikrotitravimo juostelių ar šulinėlių ir įterpkite juos į laikiklį.

Prašome paskirstyti nemažiau kaip:

- 1 šulinėlis (e.g. A1) substraktui
- 1 šulinėlis (e.g. B1) neigiamai kontrolei
- 2 šulinėlis (e.g. C1+D1) nutaūkimo kontrolei
- 1 šulinėlis (e.g. E1) teigiamai kontrolei.

Jei reikia galima nustatyti kontrolę ir paciento mėginius dvejuose egzemplioriuose.

Visi veiksmai atliekami eilės tvarka, ir be didelių laiko tarpų tarp atlikimo punktų.

Švarūs vienkartiniai galiukai turi būti naudojami paimant kiekvieną kontrolę ar mėginį.

Nustatykite inkubatorių 37 ± 1 °C.

1. įpilkite 100 µL kontrolės ir atskiestą mėginį į šulinėlius. Palikite A1 šulinėlį tuščią.
2. padenkite šulinėlius folija, kuri pateikta kartu su rinkiniu.
3. inkubuokite 1 valandą \pm 5 min prie 37 ± 1 °C.



4. Kai inkubacija bus baigta, nuimkite foliją ir ištaukite šulinėlių turinį ir tada plaukite kiekvieną šulinėlį tris kartus su 300 µl plovimo tirpalu. Venkite perpildymo. Mirkimo laikas tarp kiekvieno plovimo ciklo turi būti >5 sek. Pabaigoje atsargiai nuimkite likusį skystį bakstelėję juoste ant sugerėnčio popieriaus.

Pastaba: plovimas yra labai svarbus. Nepakankamas plovimas suteikia prastą tikslumą ir klaidingai padidėjusią absorpsijos vertę.

5. Išpilstyti 100 µl *Trichinella spiralis* baltymo A konjugato į visus šulinėlius, išskyrus tuščią šulinėlį (pvz. A1). Apdengti su folija.

6. Inkubacija po 30 min. kambario temperatūroje. Saugoti nuo tiesioginių saulės spindulių.

7. Pakartojamas 4 punktas.

8. Išpilstoma 100 µl TKK substrakto tirpalo į visus šulinėlius.

9. Inkubuojama lygiai 15 minučių kambario temperatūroje visiškoje tamsoje.

10. Išpilstoma 100 µl Sustabdymo tirpalo į šulinėlius lygiai tokia pat tvarka kaip TKK substrakto tirpalas. Atsiradusi mėlina spalva inkubacijos metu dabar pavirsta geltona.

Pastabos: Labai teigiamas paciento mėginys gali sukelti tamsių chromotogeno nuosėdų. Šios nuosėdos turi įtakos įvertinant optinį tankį. Mėginį praskiesti galima su fiziologiniu natrio chloridu, pvz. 1+1 rekomenduojama. Tada praskiesti mėginį 1 + 100 IgG mėginių skiedikliu ir padauginti iš 2 NTU rezultatus.

11. Išmatuokite bandynio absorpsiją prie 450/620 nm per 30 min po sustabdymo.

8.2. Matavimas

Nustatykite ELIZA microwell plokštelių skaitytuvą ant nulio naudodami A1 tuščią šulinėlį.

Jei skaitytuvas nenusistato ant nulio, tada A1 vertę reikia atimti iš išmatuotų bandymo verčių.

Išmatuokite visų šulinėlių absorpsiją ties 450 nm bangos ilgiu ir užregistruokite kiekvieną kontrolės ir paciento mėginio vertę. dvigubos bangos skaitymą rekomenduojama atlikti naudojant 620 nm. Jei galima apskaičiuokite visų duplikatų vidurkį.

9. Rezultatai

9.1. Vykdyti patvirtinimo kriterijus

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

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

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

9.2. Rezultatų apskaičiavimas

Ribinė vidutinė absorbsijos vertė nukirpimo kontrolės nustatymo.

Pavyzdys: Absorbsijos vertė nukirpimo kontrolės $0,39 +$ absorbsijos vertė nukirpimo kontrolės $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Nukirpimas $= 0,38$.

9.3 Rezultatų interpretavimas

Mėginiai yra laikomi teigiamais jei absorbsijos vertė yra didesnė daugiau kaip 10% už nukirpimo kontrolės vertę. Mėginiai, kurių absorbsijos 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 absorbsijos vertė yra mažesnė nei 10 %, palyginus su nukirpimo kontrole.

9.3.1. Rezultatai NovaTec vienetais

(Paciento (vidurkis) absorbsijos vertė $\times 10$) / nukirpimo kontrolės = (NovaTec vienetai = NTU)

Pavyzdys: $1,216 \times 10 / 0,38 = 32$ 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 | Cv (%) |
|------------|---|------|--------|
| Pos. Serum | 4 | 0.73 | 5.2 |
| Intraassay | n | Mean | Cv (%) |
| Pos. Serum | 8 | 0.70 | 3.9 |

10.2. Diagnostinis specifiškumas

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

Tai yra 94,8 %.

10.3. Diagnostinis jautrumas

Diagnostinis jautris apibrėžiamas kaip tikimybė, jog testas bus teigiamas, jei bandinyje yra specifinis analizuojamas objektas. Tai > 95%.

10.4. Trugdžiai

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

11. Procedūros apribojimai

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.

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 išspėjimų, 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 atskingas 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 patrinkite konjugatą ir kontrolės buteliukus nuo mikrobino užterštumo.
- Kad būtų išvengta kryžminio užterštumo ir klaidingai padidėjusių rezultatų, reikia su pipete paciento mėginius ir konjugatą išpilti be purslų tiesiai į šulnelių dugną.
- Tyrimas skirtas atlikti tik kvalifikuotoms darbuotojoms.

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.: TRIG0480DS Trichinella spiralis IgG-ELISA (96 tyrimai)

10



Esija Kaušlytė
Direktorius pavaduotoja