

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Filariose

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9400**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Anwendungsgebiet:

Screening verdächtiger klinischer Fälle und routinemäßiger Serologieuntersuchung (IgG) humaner filarialer Infektionen einschließlich lymphatischer und afrikanischer Filariose (*Wuchereria bancrofti* und *Brugia malayi*, Loiasis, Onchozerkose und Mansonelliasis).

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Acanthocheilonema viteae* somatisches Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9400-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Acanthocheilonema viteae</i> somatisches Antigen	96	Wells
DILB	9400-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9400-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9400-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9400-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9400-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9400-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9400-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9400-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μ l), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9400-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9400-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9400-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μ l der Kontrollseren 9400-06 bis -08 mit 190 μ l Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μ l Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9400-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9400-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9400-10 im Puffer 9400-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9400-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9400-02, 9400-03, 9400-04 und 9400-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9400-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9400-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9400-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9400-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9400-09 + Verdünnungspuffer	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9400-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9400-10 + 9400-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 12 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9400-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Filariose und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9400-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen die ***Acanthocheilonema viteae*** somatisches-Antigen als nicht signifikant angesehen. Bei starkem Verdacht auf Filariose, sollten die Patienten auf Mikrofilarien untersucht werden. Es kann zu einem negativen serologischen Ergebnis bei Patienten mit Mikrofilarien kommen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9400-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen die ***Acanthocheilonema viteae*** somatisches-Antigen als signifikant angesehen. Das Resultat sollte mit Bezug auf die endemische Situation und klinischen Symptome betrachtet werden.

Sensitivität und Spezifität:

Die Sensitivität und Spezifität der Bestimmung humaner Filariosen beträgt jeweils 95% und 98%. Der Test unterscheidet nicht zwischen den verschiedenen Filarieninfektion. Er dient als erste Nachweismethode.

Es tritt häufig eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* und *Echinococcus granulosus* auf. Positive Ergebnisse müssen in Bezug auf den endemischen und klinischen Hintergrund interpretiert werden.

Das Kit wurde in einem unabhängigen Labor getestet: Von insgesamt 22 Seren Filariasis-positiver Patienten (Patienten mit Mikrofilarien und/oder positiver Serologie in anderen Testverfahren und einem epidemiologischen und klinischen Hintergrund mit Filariose) waren 21 Seren mit diesem Nachweisverfahren positiv.

Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.525	1.535	0.764	1.905
Standardabweichung (A Wert)	0.026	0.070	0.068	0.112
Variationskoeffizient (%)	5.0	4.5	8.9	5.9

Referenzen:

Gueglio, B., Bordier, C. et Marjolet, M. (1995) Mise au point d'un test ELISA pour le diagnostic des filarioses humaines. Bulletin de la société Française de parasitologie. **13** : 67-72.

Laverbratt, C., Ljungström, I., Guzman, G., Thors, C., Eriksson, T. et Akuffo, H. O. (1997) Evaluation of serological assays for diagnosis of onchocercosis. Scand. J. Infect. Dis. **29** : 65 -70.



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

