

ACANTHOCHAILONEMA VITEAE

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση φιλαρίωσης σε άνθρωπο

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια

Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. **9400**
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: H-CH/CA01/IVD/01755



Προβλεπόμενη χρήση:

Διαλογή υπόπτων κλινικών περιπτώσεων ορολογικές εξετάσεις ρουτίνας (IgG) ανθρώπινων λοιμώξεων φιλαρίας, συμπεριλαμβανομένης της λεμφικής και Αφρικανικής φιλαρίωσης (Bancroftian και Malayan φιλαρίαση, Loaosis, Ογκοκέρκωση και Mansonellosis).

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε υποδοχές μικροτιτλοδότησης ευαισθητοποιημένες με σωματικά αντιγόνα **Acanthocheilonema viteae**. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ευαισθητοποιημένες υποδοχές παρέχονται ως εύθραυστες ταινίες για την οικονομική δοκιμή μικρών σειρών δειγμάτων.

Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές)

WELL	9400-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με σωματικά αντιγόνα Acanthocheilonema viteae	96	φρεάτια
DILB	9400-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
WASH	9400-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
ENZB	9400-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
STOP	9400-05	Ανασχετικό διάλυμα (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONTROL -/+	9400-07	Ασθενής θετικός ορός (διακοπή)	200	μl
CONTROL +	9400-08	Θετικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONJ	9400-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης	300	μl
SUBS	9400-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	20 1 1	δισκία τεμάχιο τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8° C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού.

Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και µl). Φιάλες. Σωλήνες για την αραίωση του ορού. Κολητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37° C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9400-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται. Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης: αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9400-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα πλύσης: αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9400-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Αρνητικός, ασθενής θετικός (διακοπή) και θετικός ορός μάρτυρα: αραιώστε 10 µl ορού μάρτυρα 9400-06 έως -08 σε 190 µl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (τελική αραίωση 1/20).

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 µl ορού σε 2.0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (τελική αραίωση 1/201).

Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης: αραιώστε σύζευγμα 9400-09, σε ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (τελική αραίωση 1/51).

Διάλυμα υποστρώματος: προθερμάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9400-04 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν την προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια ELISA, διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9400-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 9400-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων).

Ανασχετικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9400-05 μη αραιωμένο.



Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα: Τα διαλύματα 9400-02, 9400-03, 9400-04 και 9400-09 περιέχουν αντίστοιχα 0,1%, 0,05%, 0,01% και 0,1% αζίδιο του νατρίου (NaN_3). Το διάλυμα 9400-02 περιέχει 0,02% μερθειολικού. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές. Το ανασχετικό διάλυμα 9400-05 (0,5 M K_3PO_4) είναι ερεθιστικό.

Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9400-06 έως -08) είναι από κουνέλια.

Όγκοι προς προετοιμασία:

			Συνολικός αριθμός φρεατίων προς χρήση			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Σύζευγμα	9400-09 + ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Ορός μάρτυρα	9400-06 έως -08 + ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Οροί προς δοκιμή	Ορός + ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Διάλυμα υποστρώματος	9400-10 + 9400-04	δισκ. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Διαδικασία:

Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης.

Επώαστε για 5 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικό, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα (100 μl το καθένα).

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τους αραιωμένους ορούς προς δοκιμή (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης σε κάθε φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 4: Επώαστε με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων, εξαλείψτε τις φυσαλίδες και μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm.

Ερμηνεία

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200, A του αρνητικού μάρτυρα < 12% του A του θετικού μάρτυρα, A κενό έναντι αέρα < 0,350.

Ο τίτλος του ασθενούς θετικού (διακοπή) ορού 9400-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλτιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις φιλαρίασης και υγιείς ανθρώπινους ορούς.

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9400-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι σωματικών αντιγόνων ***Acanthocheilonema viteae*** είναι κλινικώς μη σημαντική. Εάν υπάρχει έντονη υποψία για φιλαρίαση, οι ασθενείς πρέπει να εξετάζονται για μικροφιλαρίαση. Ενδέχεται να παρατηρηθεί αρνητική ορολογία σε ασθενείς με μικροφιλαρίαση.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού μάρτυρα 9400-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι σωματικών αντιγόνων ***Acanthocheilonema viteae*** θεωρείται κλινικώς σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να εξεταστεί σε σχέση με την ενδημική κατάσταση και τα κλινικά συμπτώματα.

Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Η ευαισθησία και η εξειδίκευση της δοκιμής για ανθρώπινη φιλαρίαση είναι αντίστοιχα 95% και 98 %. Η εξέταση αυτή δεν διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων λοιμώξεων φιλαρίασης. Χρησιμοποιείται ως πρώτη μέθοδος διαλογής.

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα συχνά προκύπτει με αντισώματα σε άλλα παράσιτα, όπως *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* et *Echinococcus granulosus*. Τα θετικά αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται σε σχέση με το ενδημικό και κλινικό υπόβαθρο.

Το kit έχει αξιολογηθεί από ανεξάρτητο εργαστήριο: Από τους 22 ορούς από ασθενείς θετικούς στη φιλαρίαση (ασθενείς με μικροφιλαρίαση και/ή με θετική ορολογία με άλλες τεχνικές και επιδημιολογικό και κλινικό υπόβαθρο φιλαρίασης) οι 21 οροί βρέθηκαν θετικοί στην εξέταση αυτή. Η εσωτερική αξιολόγηση έδειξε ότι αιμορραγικοί, λιπαιμικοί και ικτερικοί οροί δεν παρεμβαίνουν με τα αποτελέσματα της δοκιμής.

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή. Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (απορρόφηση)	0,525	1,535	0,764	1,905
Τυπική απόκλιση (απορρόφηση)	0,026	0,070	0,068	0,112
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	5,0	4,5	8,9	5,9

Αναφορές:

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

