

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej filariózy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. 9400
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/01755



Plánované použitie:

Kontrola možných klinických prípadov a rutinná sérológia (IgG) ľudských filariózných infekcií, vrátane lymfatickej a africkej filariózy (filarióza bancrofti a malajzijská filarióza, loaóza, onchocerciáza, mansonióza).

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitivovaných somatickými antigénmi *Acanthocheilonema viteae*. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalickej fosfatázy. Senzitivované platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9400-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované somatickými antigénmi <i>Acanthocheilonema viteae</i>	96	jamky
DILB	9400-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9400-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9400-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9400-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9400-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9400-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9400-09	Proteín A – konjugát alkalickej fosfatázy	300	µl
SUBS	9400-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μ l). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9400-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysúšacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9400-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9400-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μ l kontrolných sér 9400-06 až -08 v 190 μ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μ l séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9400-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9400-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9400-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9400-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9400-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9400-02, 9400-03, 9400-04 a 9400-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 9400-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9400-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9400-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9400-09 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9400-06 až -08 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9400-10 + 9400-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 12 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Titer slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9400-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov filariózy a a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9400-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti somatickým antigénom ***Acanthocheilonema viteae*** klinicky zanedbateľná. Ak je vážne podozrenie na filariózu, pacienti by mali byť testovaní na mikrofilárie. Negatívna sérológia sa môže vyskytnúť u pacientov s mikrofilariémiou.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9400-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti somatickým antigénom ***Acanthocheilonema viteae*** považovaná za klinicky významnú. Tento výsledok by sa mal brať do úvahy s ohľadom na danú endemickú situáciu a klinické symptómy.

Citlivosť a presnosť testu:

Citlivosť a presnosť testu na ľudskú filariózu sú v menovanom poradí 95 % a 98 %. Tento test nerozlišuje medzi rôznymi filariálnymi infekciami. Používa sa ako prvá diagnostická metóda.

Skrížená reaktivita sa často vyskytuje s protilátkami proti iným parazitom ako sú *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* a *Echinococcus granulosus*. Pozitívne výsledky treba interpretovať s ohľadom na endemickú a klinickú situáciu.

Súpravu zhodnotilo nezávislé laboratórium : z 22 sér od pacientov pozitívnych na filariózu (pacienti s mikrofilariémiou a/alebo s pozitívnou sérológiou robenou inými spôsobmi a epidemiologickým a klinickým podložením pre filariózu) bolo týmto testom určených 21 pozitívnych sér. Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.525	1.535	0.764	1.905
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.026	0.070	0.068	0.112
Variačný koeficient (%)	5.0	4.5	8.9	5.9

Odkazy na použitú literatúru:

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

