

ACANTHOICHEILONEMA VITEAE

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human filariasis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9400
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Tilsigtet anvendelse:

Undersøgelse af mistænkte kliniske tilfælde og rutine-serologi (IgG) af human filariasis infektioner, herunder lymfatisk og afrikansk filariasis (bancroftian og malayan filariasis, loaosis, onchocercosis og mansonellosis).

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Acanthocheilonema viteae* somatiske antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9400-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Acanthocheilonema viteae</i> somatiske antigener	96	brønde
DILB	9400-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9400-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9400-04	Enzymbuffer	50	ml
STOP	9400-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	9400-07	Svagt positivt serum	200	µl
CONTROL +	9400-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	9400-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	9400-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklebende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9400-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9400-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9400-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μ l kontrolsera 9400-06 til -08 i 190 μ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9400-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 9400-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9400-10 i ufortyndet buffer 9400-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 9400-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 9400-02, 9400-03, 9400-04 og 9400-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (N_3Na). Løsning 9400-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9400-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9400-06 til -8) er fra kaniner.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9400-09 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9400-06 til -8 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9400-10 + 9400-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 12 % af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9400-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af filariasis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9400-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod ***Acanthocheilonema viteae*** somatiske antigener klinisk ikke signifikant. Hvis der er stærk mistanke om filariasis, bør patienten undersøges for mikrofilariier. Negativ serologi kan observeres i patienter med mikrofilaria.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af den svagt positive kontrol 9400-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod ***Acanthocheilonema viteae*** somatiske antigener for at være klinisk signifikant. Dette resultat bør overvejes, når det gælder den endemiske situation og de kliniske symptomer.

Analysens sensitivitet og specificitet:

Sensitiviteten og specificiteten af testen for human filariasis er respektive 95% og 98%. Denne test skelner ikke mellem de forskellige filariasis infektioner. Den bruges som første undersøgelsesmetode. Krydsreaktivitet forekommer ofte med antistoffer til andre parasitter såsom *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* et *Echinococcus granulosus*. Positive resultater skal tolkes i forhold til den endemiske og kliniske baggrund.

Kittet er blevet evalueret af et uafhængigt laboratorium: Ud af 22 sera fra positive patienter med filariasis (patienter med mikrofilariier og/eller med positiv serologi med andre teknikker og en epidemiologisk og klinisk baggrund af filariasis) var 21 sera positive i denne test. Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	0,525	1,535	0,764	1,905
Standardafvigelse (absorbans)	0,026	0,070	0,068	0,112
Variationskoefficient (%)	5,0	4,5	8,9	5,9

Referencer:

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

