

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga filariosis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9400
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Avsedd användning:

Undersökning av klinisk misstänkta fall och rutin serologi (IgG) mänskliga filariosis infektioner inklusive lymphatique och afrikansk filariosis (Bancroftian and Malayan filariosis, Loaosis, Onchocercosis and Mansonellosis).

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med ***Acanthocheilonema viteae*** somatisk antigen. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 provningar):

WELL	9400-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Acanthocheilonema viteae</i> somatisk antigen	96	brunnar
DILB	9400-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9400-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9400-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9400-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9400-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9400-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9400-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9400-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9400-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9400-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9400-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 9400-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9400-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9400-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9400-10 i utspädd buffert. 9400-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9400-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9400-02, 9400-03, 9400-04 och 9400-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9400-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9400-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9400-06 till -08) är från kaniner.

Volymerna att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9400-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9400-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9400-10 + 9400-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 12 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Titern av den svagt positiva (avskurna) serum 9400-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av filarioses och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9400-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot ***Acanthocheilonema viteae*** somatisk antigener är kliniskt icke signifikant. Om filariasis är starkt misstänkt, bör patienter undersökas för microfilariae. Negativ serologi kan observeras i patienter med microfilaremia.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9400-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot ***Acanthocheilonema viteae*** somatisk antigener anses vara kliniskt signifikant. Detta resultat bör övervägas när det gäller den endemiska situationen och kliniska symptom.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

Känsligheten och specificiteten av testet för mänsklig filarioses är respektive 95 % och 98 %. Detta test skiljer inte mellan dem olika filarial infektionerna. Det används som den första undersökningsmetoden. Korsreaktivitet ofta förekommer med antikroppar till andra parasiter som *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* et *Echinococcus granulosus*. Positiva resultat måste tolkas i förhållande till den endemiska och klinisk bakgrunden.

Kiten har utvärderats av oberoende laboratorium: ut av 22 sera från positive patienter med filariasis (patienter med microfilaremia och/eller positiv serologi med andra tekniker och en epidemiologisk och klinisk bakgrund av filariasis) 21 sera var positiva i detta test. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0.525	1.535	0.764	1.905
Standardavvikelse (absorbans)	0.026	0.070	0.068	0.112
Variationskoefficient (%)	5.0	4.5	8.9	5.9

Referenser:

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

