

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Enzymatický imunologický test pro diagnózu filariózy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. **9400**
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/01755



Zamýšlené použití:

Vyšetření podezřelých klinických případů a rutinní sérologie (IgG) filariálních infekcí u lidí, včetně lymfatické a africké filariózy (Bancroftova a malajská filarióza, loaóza, onchocerkóza a mansonelliáza).

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících somatické antigeny ***Acanthocheilonema viteae***. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9400-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující somatické antigeny <i>Acanthocheilonema viteae</i>	96	destiček
DILB	9400-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9400-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9400-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9400-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9400-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9400-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9400-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9400-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a µl). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9400-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9400-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9400-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 µl kontrolního séra 9400-06 na -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 µl séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9400-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9400-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9400-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9400-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9400-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9400-02, 9400-03, 9400-04 a 9400-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 9400-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9400-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9400-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9400-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9400-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9400-09 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9400-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 12% A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9400-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů filariózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9400-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti somatickým antigenům **Acanthocheilonema viteae** klinicky nevýznamná. Pokud existuje velké podezření na filariózu, je nutné pacienty také vyšetřit na mikrofilariózu. Negativní sérologie se může vyskytnout u pacientů s mikrofilariemi.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního kontrolního vzorku 9400-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti somatickým antigenům **Acanthocheilonema viteae** považována za klinicky významnou. Tento výsledek je nutné zvažovat s ohledem na endemickou situaci a klinické symptomy.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost a specifita testu pro filariózu u lidí činí 95 % a 98 %. Tento test nerozlišuje mezi různými filariálními infekcemi. Používá se jako první metoda vyšetření.

K příčné reaktivitě často dochází u protilátek na jiné parazity, například *Ascaris*, *Trichinella*, *Ancylostoma*, *Fasciola hepatica* a *Echinococcus granulosus*. Pozitivní výsledky je nutné interpretovat ve vztahu k endemickému a klinickému pozadí.

Sada byla vyhodnocena nezávislou laboratoří: Z 22 sér od pozitivních pacientů na filariózu (pacienti s mikrofilariemi a/nebo s pozitivní sérologií dělanou dalšími metodami a epidemiologickým a klinickým pozadím filariózy) bylo pomocí tohoto testu pozitivních 21 sér. Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze. Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,525	1,535	0,764	1,905
Standardní odchylka (absorbance)	0,026	0,070	0,068	0,112
Koeficient odchylky (%)	5,0	4,5	8,9	5,9

Reference:

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.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

