

Ascaris IgG ELISA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Askariasis

96 Tests in einzelnen Wells für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz



Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. 9250
UDI-DI: 07640158219256



Anwendungsgebiet:

Der Bordier *Ascaris* IgG ELISA-Kit ist zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Parasiten der Gattung *Ascaris* in humanem Serum bestimmt. Serologie ist eine Diagnosehilfe und kann nicht als allein stehende Methode zur Diagnosestellung verwendet werden.

Hintergrund-Informationen:

Ascaris (hauptsächlich *A. lumbricoides* und *A. suum*) verursacht wird. Sie tritt am häufigsten bei Kindern in tropischen und subtropischen Regionen auf, insbesondere in Gebieten mit schlechter sanitärer und hygienischer Versorgung. Menschen infizieren sich durch versehentliche perorale Aufnahme infektiöser Eier über kontaminierten Boden, Wasser oder Nahrung. Nach der Aufnahme von Eiern schlüpfen Larven im Dünndarm und wandern anschließend hauptsächlich über die Blutbahn in die Leber und dann in die Lunge. Die Schäden, welche dort verursacht werden können, sind hauptsächlich von der Infektionsintensität abhängig. Von der Lunge aus wandern die gehäuteten Larven über die Luftröhre zum Rachen, wo die meisten von ihnen abgeschleckt werden, und so in den Magen-Darm-Trakt gelangen. Die Larven reifen im Dünndarm zu erwachsenen Würmern heran, wo sie sehr lange - bis zu Jahren - leben und sich geschlechtlich vermehren können. Viele akut und/oder chronisch infizierte Personen zeigen keine direkten Symptome. In einigen Fällen treten jedoch klinische Zeichen im Lungenstadium (anhaltender Husten, Kurzatmigkeit und Keuchen) und/oder im Darmstadium (Oberbauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall) auf. Die Diagnose basiert primär auf dem Nachweis von Eiern im Stuhl, entsprechende klinische Problematik, einer Expositionsvorgeschichte sowie einem positiven Ergebnis durch serologische Tests.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das komplette benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er brechbaren Mikrotiterplatte, deren Wells mit **Ascaris** löslichen-Antigenen beschichtet sind. Spezifische Antikörper werden sich an das Antigen anheften, wobei unspezifische Bestandteile durch Abwaschen entfernt werden können. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Beim wiederholten Abwaschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt mit pNPP-Substrat, der bei Kontakt mit alkalischer Phosphatase gelb wird. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge von spezifischen *Ascaris*-Antikörpern in der Probe. Die Reaktion wird mit Dikaliumhydrogenphosphat unterbrochen. Zum Auslesen der Absorbanz bei 405 nm wird ein ELISA-Microplattenleser verwendet.

Der Test ist manuell, kann aber mit automatischen Systemen durchgeführt werden, die vom Benutzer validiert werden müssen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9250-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit Ascaris löslich Antigene	96	Wells
DILB	9250-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat, violette Färbung	50	ml
WASH	9250-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9250-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9250-05	Stopp Lösung (0,5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9250-06	Negatives Kontroll-Serum (20 x), grüne Verschlusskappe	200	µl
CONTROL -/+	9250-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum (20 x), gelbe Verschlusskappe	200	µl
CONTROL +	9250-08	Positives Kontroll-Serum (20 x), rote Verschlusskappe	200	µl
CONJ	9250-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat (50 x), violette Verschlusskappe	300	µl
SUBS	9250-10	Phosphatase Substrat (para-Nitrophenylphosphat)	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung des Kits bei +2°C bis +8°C (Transport validiert zwischen -20°C und +37°C für 21 Tage). Die Komponenten sollten direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt werden. Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Das Verfallsdatum nach dem Öffnen der Reagenzien ist bei einer Lagertemperatur bei +2°C bis +8°C gültig.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und µl). Messzylinder. Röhrchen zur Probenverdünnung. Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken. Destilliertes Wasser. Inkubator +37°C. ELISA Reader mit Filter: 405 nm. Manuelle oder automatische Ausrüstung zum Spülen der Wells. Vortexmischer. Stoppuhr.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Alle Reagenzien mindestens 1 Stunde bei +20°C bis +30°C bringen und gut vermischen.

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen 9250-01 entnehmen (einen Teststreifen für die Blindprobe und drei Teststreifen für die Kontrollen plus die Anzahl der Proben). Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder-verschliessbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9250-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Dies wird für die Verdünnung von Kontroll-Serum, Proben und Konjugaten verwendet. Der Verdünnungspuffer ist bei +2°C bis +8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9250-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten. Der verdünnte Waschpuffer ist bei +2°C bis +8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Kontroll-Serum: Je 10µl der Kontrollseren 9250-06 bis -08 mit 190 µl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt). Das verdünnte Kontrollserum ist bei +2°C bis +8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Konjugat: Das Konzentrat 9250-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:50 verdünnt. Die Verdünnung des Konjugats muss am Tag der Probeentnahme stattfinden. Verdünntes Konjugat nicht lagern.

Substrat-Lösung: Die Substrattabletten 9250-10 in unverdünntem Enzympuffer 9250-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen. Substrat am Tag der Probeentnahme verdünnen und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Tabletten und Substratlösungen sollten eine leicht gelbliche oder keine Färbung aufweisen. Tabletten und Substrate mit einer gelben Färbung sollten aufgrund möglicher Hydrolysisierung entsorgt werden. Substratlösung nicht lagern.

Stopp-Lösung: Reagenz 9250-05 gebrauchsfertig.

Probenvorbereitung und -Lagerung:

Humanes Serum verwenden. Bei Analyse innerhalb von 7 Tagen zwischen +2°C und +8°C lagern, anderenfalls bei -20°C oder niedriger lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Probenmaterial mischen und 1:201 in Verdünnungspuffer Lösung auflösen (z.B. 5 µl Probe in 1,0 ml). Verdünnte Probe nicht lagern.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

Die Mengen der giftigen Substanzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Komponente	Referenz	Natriumazid (N _a N ₃)	Thiomersal
Verdünnungspuffer (10 x)	9250-02	0,1%	0,02%
Waschpuffer (10 x)	9250-03	0,05%	/
Enzympuffer	9250-04	0,01%	/
Kontrollserum (20 x)	9250-06 bis -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9250-09	0,1%	/

Natriumazid und Thiomersal in den angegebenen Konzentrationen sind bei Haut- oder Schleimhautkontakt nicht giftig.

Komponente	Gefährliche Komponente	Gefahren Piktogramm	Gefahrenhinweis	Sicherheitshinweis
Stopp Lösung	Kaliumphosphat tribasisch		Verursacht schwere Augenschäden	Augenschutz. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen

- Die Negativ-, Schwellen- und Positivkontrollseren (9250-06 bis -08) sind tierischen Ursprungs (Kaninchen) und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden.
- Alle Reagenzien und Proben sollten als potenziell ansteckendes Material behandelt werden.
- Reagenzien zwischen einzelnen Einheiten und Bordier ELISA-Kits nicht austauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht zusammen mit den Reagenzien aus diesem Kit verwenden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht verwenden.
- Reagenzflaschen unmittelbar nach Gebrauch dicht verschliessen. Flaschendeckel dürfen nicht vertauscht werden, um gegenseitige Kontamination zu vermeiden.

- Separate und saubere Pipettenspitzen für jede Patientenprobe verwenden.
- Mikrowells nur einmal verwenden.
- Vermeiden Sie eine Beschädigung der Mikrowells durch mechanische Einwirkungen (Kegel, Düsen).
- Die Beschreibungen der auf den Etiketten verwendeten Symbole finden Sie auf der Website www.bordier.ch.

Entsorgung:

Die in diesem Test verwendeten Materialien gelten als gefährliche Abfälle. Entsorgung gefährlicher Abfälle muss entsprechend den nationalen und regionalen Rechtsvorschriften stattfinden.

Durchführung:

Blasenbildung während des Nachweisverfahrens vermeiden.

Schritt 1: Vorinkubation:

Die Wells mit 250 µl Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei +20°C bis +30°C inkubieren.

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (serumfreier Blank).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren. Für Nachweisverfahren mit mehr als 25 Proben wird eine Duplikaterstellung mit den drei verbleibenden Wells empfohlen.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei +37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren (einschliesslich serumfreier Blankwert).

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei +37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei +37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden, falls notwendig, abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe der Stopp-Lösung messen.

Ergebnis-Auswertung:

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1,200
- A der schwach positiven Kontrolle > 13% der A der positiven Kontrolle
- A der negativen Kontrolle < 8% der A der positiven Kontrolle
- A des serumfreien Blanks < 0,350

Falls das von der Probe gelieferte Signal den Messbereich des Mikroplatten-Readers überschreitet, sollte der Wert zugewiesen werden, der dem oberen Messbereich des Readers entspricht. Qualitätskontrollen aktueller Testeinheiten sind auf unserer Internetseite zu finden: www.bordier.ch.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9250-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Askariasis und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Der Cutoff-Index einer Probe ist definiert wie folgt. - Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Ascaris**-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe oder gleich **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Ascaris**-Antigen als signifikant angesehen. Es zeigt, dass der Patient Kontakt mit dem Parasiten hatte. Die Unsicherheitsbereich sollte von jedem Labor ausgehend von der Patientenpopulation einzeln definiert werden. Bei Ergebnissen im Unsicherheitsbereich wird eine Wiederholung des Tests mit einer neuen Probe nach 2 bis 4 Wochen empfohlen.

Bei positiven oder unklaren Ergebnissen empfehlen wir die Durchführung eines Bestätigungstests (meist durch Western Blot), sofern ein solcher Test verfügbar oder aufgrund nationaler Vorschriften erforderlich ist.

Analytische Leistungen:

Analytische Spezifität:

Eine Spezifität von 66% wurde bei einer Gruppe von 41 Seren von Patienten mit anderen Parasiteninfektionen ermittelt. Kreuzreaktivität tritt vor allem bei Patienten mit Toxocariasis und Trichinellose auf.

Es wurden keine positiven oder negativen Interferenzen mit supraphysiologischen Konzentrationen von Hämoglobin, Lipiden oder Bilirubin in Seren beobachtet, die mit Interferenzen ergänzt wurden.

Erläuterung:

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben im Duplikat in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0,627	1,633	0.692	1.851
Standardabweichung (A Wert)	0,038	0,068	0.036	0.073
Variationskoeffizient (%)	6,1	4,2	5.2	3.9

Klinische Leistungen:

Diagnostische Sensitivität:

Eine Sensitivität von 81% wurde bei einer Gruppe von 27 Seren positiv mit *Ascaris suum* Rohextrakt-antigen und negativ mit dem Bordier *Toxocara canis* ELISA-Kit ermittelt.

Diagnostische Spezifität:

Eine Spezifität von 75% wurde bei einer Gruppe von 44 Seren positiv mit *Ascaris suum* Rohextrakt-antigen und positiv mit dem Bordier *Toxocara canis* ELISA-Kit ermittelt. Eine Spezifität von 96% wurde bei einer Gruppe von 181 Seren von Schweizer Blutspendern ermittelt. Eine Spezifität von 98% wurde bei einer Gruppe von 96 Seren von Patienten einer Schweizer Infektiologie-Abteilung ermittelt.

Bei 147 der 150 negativen Proben wurde mit einer anderen kommerziellen Methode zum Nachweis von Anti-*Ascaris*-Antikörpern ein negatives Ergebnis gefunden. Bei 8 der 9 mit dieser Technik positiven Proben wurde ein positives Ergebnis gefunden.

Positiver (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV):

Für die obengenannten Populationen wurde ein PPV von 52% und ein NPV von 92% ermittelt.

Erwartete Werte in normalen und betroffenen Populationen:

In einer Normalpopulation von 180 Schweizer Blutspendern, 96 Seren aus einer Schweizer Infektiologie-Abteilung und 44 Seren positiv mit *Ascaris suum* Rohextrakt-Antigen und positiv mit dem Bordier *Toxocara canis* ELISA-Kit beträgt der erwartete Indexwert 0,46. In einer betroffenen Population mit 27 Seren positiv mit *Ascaris suum* Rohextrakt-Antigen und negativ mit dem Bordier *Toxocara canis* ELISA-Kit beträgt der erwartete Indexwert 1,21.

Zwischenfälle:

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

Grenzen:

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand von Ergebnissen eines einzelnen Tests erfolgen. Die vollständige Diagnosestellung sollte unter Berücksichtigung der endemischen Situation, Krankengeschichte und Symptomatik sowie unter Verwendung von bildgebenden Verfahren sowie serologischen Daten stattfinden.

Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten haben die serologischen Daten eine beschränkte Aussagekraft.

Referenzen:

Schneider, R. and Auer, H. (2016) Incidence of *Ascaris suum*-specific antibodies in Austrian patients with suspected larva migrans visceralis (VLM) syndrome. *Parasitology Research* **115**, 1213-1219.

Dana D, Vlaminc J, Ayana M, Tadege B, Mekonnen Z, Geldhof P, et al. (2020) Evaluation of copromicroscopy and serology to measure the exposure to *Ascaris* infections across age groups and to assess the impact of 3 years of biannual mass drug administration in Jimma Town, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* **14**(4).



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

