

Ascaris IgG ELISA

Encimski imunski test za diagnozo askarioze pri ljudeh

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 9250
Uredba ES št.: CH-202205-0023 - UDI-DI: 07640158219256



Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Ascaris* IgG ELISA je namenjen kvantitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti *Ascaris* rodu v človeškem serumu. Serologija je pomoč pri diagnosticiranju in je ni mogoče uporabiti kot edino diagnostično metodo.

Ozadje:

Askarioza je svetovna okužba s helminti, ki jo povzročajo nekateri helminti iz rodu *Ascaris*, ki se prenašajo po tleh (večinoma *A. Lumbricoides* in *A. suum*). Najpogosteje se pojavi pri otrocih v tropskih in subtropskih predelih, zlasti na območjih s slabimi sanitarnimi in higienskimi razmerami. Ljudje se lahko okužijo z nenamernim zaužitjem kužnih jajčec na kontaminirani zemlji, vodi ali hrani. Po zaužitju jajčec se ličinke izležejo v tankem črevesu in selijo večinoma po krvnem obtoku v jetra, nato pa v pljuča, kjer lahko povzročijo poškodbe, ki so odvisne od intenzivnosti okužbe. Iz pljuč potujejo oblikovane ličinke preko sapnika v grlo, kjer jih večina pogoltne in tako dosežejo prebavila. Ličinke dozoriijo v odrasle črve v tankem črevesu, kjer živijo in se spolno razmnožujejo zelo dolgo, tudi do leta. Večina okuženih ljudi ne kaže nobenih simptomov. Vendar pa se v nekaterih primerih simptomi pojavijo v pljučnem stadiju (vztrajen kašelj, zadihanost in piskajoče dihanje) ali v črevesnem stadiju (bolečine v trebuhu, slabost, bruhanje in driska). Diagnoza temelji na odkritju jajčec v blatu, znakih in simptomih ter anamnezi izpostavitvi in pozitivnem rezultatu serološkega testiranja.

Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z *Ascaris* topni antigeni. Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost zajedavsko specifičnih protiteles se odkrije s konjugatom proteina A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Ascaris* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčita z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test se lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, vendar mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

Material v kompletu (96 testov):

WELL	9250-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z <i>Ascaris</i> topni antigeni	96	vdolbinic
DILB	9250-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
WASH	9250-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
ENZB	9250-04	Encimski pufer	50	ml
STOP	9250-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9250-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	μl
CONTROL -/+	9250-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	μl
CONTROL +	9250-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	μl
CONJ	9250-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	μl
SUBS	9250-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablet
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet hranite pri 2° do 8°C (transport pri sobni temperaturi), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete pri 2-8°C.

Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in μ l). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na 37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente segrejte na sobno temperaturo in jih pred uporabo premešajte.

Vdolbinice ELISA: odprite stran aluminijaste vrečke 9250-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 9250-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je pri 2-8°C stabilen 2 meseca.

Raztopina za pranje: razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 9250-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrom, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je pri 2-8°C stabilna 2 meseca.

Kontrolni serumi: razredčite 10 μ l kontrolnega seruma 9250-06 do -08 v 190 μ l raztopine pufru za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so pri 2-8°C stabilni 2 meseca.

Konjugat: razredčite konjugat 9250-09 v raztopini pufru za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

Raztopina substrata: raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 9250-10 v nerazredčenem encimskem pufru 9250-04 (1 tableta v 2,5 ml pufru). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtенок. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

Raztopina za zaustavitev: uporabite nerazredčen reagent 9250-05.

Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti pri 2-8°C, če ga analiziramo v nekaj dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju.

Vzorci premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufru za redčenje (na primer 5 μ l vzorca v 1,0 ml).

Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N_3Na)	Mertiolat
Pufer za redčenje	9250-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	9250-03	0,05%	/
Encimski pufer	9250-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9250-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9250-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

- Raztopina za zaustavitev 9250-05 (0,5 M K_3PO_4) je dražilna.
- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (9250-06 do -08) so pridobljeni iz kuncev.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjajte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjajte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu www.bordier.ch.

Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

1. korak: Blokiranje:

Vdolbinice popolnoma napolnite z raztopino pufru za redčenje.

Inkubacija znaša 5 do 15 minut pri sobni temperaturi (blokiranje).

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufru za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 13% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 8% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani www.bordier.ch.

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov askarioze in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 9250-07.

Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Ascaris** klinično nepomembna.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Ascaris** klinično pomembna. To pomeni, da je imel bolnik stik s parazitom.

Vsak laboratorij lahko opredeli sivo cono glede na populacijo bolnikov. V primeru mejnih ali dvomljivih rezultatov priporočamo ponovitev testa ponovno po 2-4 tednih s svežim vzorcem.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

Analitične zmogljivosti:

Analitična specifičnost:

Pri 41 serumih bolnikov z drugimi zajedavskimi okužbami je bila ugotovljena 66-odstotna specifičnost testa. Navzkrižna reaktivnost se pojavlja večinoma pri bolnikih s toksokarozo in trihinelozo.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopoljenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

Natančnost:

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 10 vdolbinicah na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
Povprečje (absorbanca)	0,627	1,633	0,692	1,851
Standardni odklon (absorbanca)	0,038	0,068	0,034	0,067
Koeficient variacije (%)	6,1	4,2	5,0	3,6

Naslednjih zmogljivosti ni mogoče ovrednotiti, ker za to analizo ni certificiranega referenčnega materiala:

- Analitična občutljivost (meje zaznavnosti in kvantifikacije)
- Natančnost
- Resničnost
- Merilno območje
- Linearnost.

Klinične zmogljivosti:

Diagnostična občutljivost:

Pri 27 pozitivnih serumih z antigenom surovega izvlečka *Ascaris suum* in negativnih serumih s kompletom ELISA *Toxocara canis* Bordier je bila ugotovljena 81-odstotna občutljivost testa.

Diagnostična specifičnost:

Pri 44 pozitivnih serumih z antigenom surovega izvlečka *Ascaris suum* in pozitivnih serumih s kompletom *Toxocara canis* Bordier ELISA je bila ugotovljena 75-odstotna občutljivost testa. Pri 181 serumih (švicarskih) krvodajalcev je bila ugotovljena 96-odstotna specifičnost testa. Pri 96 serumih bolnikov iz (švicarske) enote za infektologijo je bila ugotovljena 98-odstotna specifičnost testa.

Pri 147 od 150 negativnih vzorcev je bil z drugo komercialno tehniko za odkrivanje protiteles proti Askarisu ugotovljen negativen rezultat. S to tehniko je bil pri 8 od 9 pozitivnih vzorcev ugotovljen pozitiven rezultat.

Pozitivna in negativna napovedna vrednost:

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 52% in NPV 92%.

Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:

Pri zdravi populaciji 180 švicarskih krvodajalcev, 96 serumov iz švicarske enote za infektologijo in 44 serumov, pozitivnih z antigenom surovega izvlečka *Ascaris suum* in pozitivnih s kompletom *Toxocara canis* Bordier ELISA, je pričakovana indeksna vrednost 0,46. Pri prizadeti populaciji 27 serumov, pozitivnih z antigenom surovega izvlečka *Ascaris suum* in negativnih s kompletom *Toxocara canis* Bordier ELISA, je pričakovana indeksna vrednost 1,21.

Incidenti:

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

Omejitve:

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslABLJENIM imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

Reference:

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, Vlamincck 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 SA

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Švica.

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

