

Anisakidae IgG ELISA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu trávicí anisakidóza u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití



Návod k použití pro produkt č. 9800
UDI-DI: 07640158219805



Předpokládané použití:

Sada *Anisakidae* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena ke kvalitativní detekci protilátek IgG proti parazitům čeledi *Anisakidae* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

Pozadí:

Anisakidóza je celosvětově rozšířená helmintická zoonóza, kterou způsobují některé hlístice z čeledi *Anisakidae* vyskytující se u mořských ryb. Lidé se mohou infikovat požitím syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného kontaminovaného rybího masa. Dospělí červi hlístice z čeledi *Anisakidae* žijí v trávicím traktu mořských savců (konečných hostitelů). Po embryonaci ve vodě se z vajíček do vody uvolňují infikující larvy stádia L3, které jsou požitý planktonními koryši (mezihostiteli). Po požití rybami nebo hlavonožci (paratenickými hostiteli) larvy migrují do vnitřností a peritoneální dutiny a dále se již nevyvíjejí. Po požití mořskými savci se z larev vyvinou dospělí červi. Člověk, náhodný hostitel, je pro parazita slepá ulička. Většina nakažených lidí nevykazuje žádné příznaky. V některých případech se však příznaky projevují, a to v žaludečním stádiu (bolest epigastria, nevolnost a zvracení), ve střevním stádiu (bolest břicha, nevolnost, zvracení a průjem) nebo v alergickém stádiu (kopřivka, pruritus, angioedém a bronchospasmus). Diagnóza je založena na projevech a příznacích společně s anamnézou expozice a na pozitivním výsledku sérologického testu.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících vylučované/vyměšované (E/S) larvální antigeny *Anisakidae*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Anisakidae* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test je manuální, ale lze jej provést i automatickými systémy, které musí být validovány uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	9800-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující E/S antigeny <i>Anisakidae</i>	96	destiček
DILB	9800-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	50	ml
WASH	9800-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9800-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9800-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9800-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	9800-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	9800-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	9800-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	9800-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablety
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Soupravu skladujte při teplotě mezi +2°C až +8°C (přeprava validovaná mezi -20°C a +37°C po dobu 21 dnů), chraňte před dlouhodobým vystavením jejich součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě mezi +2°C až +8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

Příprava činidel před použitím:

Všechny činidla nechte alespoň 1 hodinu zahřát v rozmezí +20°C až +30°C a před použitím promíchejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 9800-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9800-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) vyplachovacího roztoku 9800-03 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Kontrolní séra: Zředte 10 µl kontrolního séra 9800-06 až -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/20). Naředěné kontrolní séra je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 9800-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu(-y) substrátu fosfatázy 9800-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9800-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

Zastavovací roztok: Použijte neředěné činidlo 9800-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Pokud je test proveden do 7 dnů, skladujte sérum při teplotě mezi +2°C až +8°C, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování. Rozmixujte vzorky a naředte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml). Naředěné vzorky neuchovávejte.

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Složka	Odkaz	Nitrid sodný (Na_3N_3)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9800-02	0,1%	0,02%
Vyplachovací roztok (10 x)	9800-03	0,05%	/
Tlumicí enzym	9800-04	0,01%	/
Kontrolní séra (20 x)	9800-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9800-09	0,1%	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

Složka	Nebezpečná složka	Nebezpečí piktogram	Prohlášení o nebezpečnosti	Preventivní prohlášení
Zastavovací roztok	Tribasový fosforečnan draselný		Způsobuje vážné poškození očí	Používejte ochranné brýle. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní séra (9800-06 až -08) jsou zvířecího původu (králíci) a musí se s nimi zacházet opatrně.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

- Zabraňte poškození mikrojamek mechanickým působením (špičky/kužele, trysky).
- Popisy symbolů použitých na etiketách naleznete na webových stránkách www.bordier.ch.

Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

Krok 1: Předinkubace:

Naplňte jamky 250 µl ředícího pufru.

Inkubujte 5 až 15 minut při teplotě +20°C až +30°C.

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

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (vzorku bez séra).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky vzorku bez séra).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček vzorku bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A slabě pozitivního kontrolního vzorku > 9% A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 8% A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

V případě, že signál vzorku překračuje měřicí rozsah čtečky mikrodestiček, měla by být přiřazena hodnota odpovídající hornímu měřicímu rozsahu čtečky.

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9800-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů anisakidózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než **1,0**. V tomto případě, je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Anisakidae** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší nebo rovná než **1,0**. V tomto případě, je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Anisakidae** považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech, doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

V případě pozitivního nebo nejasného výsledku, doporučujeme provést potvrzovací test (nejčastěji metodou Western blot), pokud je takový test k dispozici nebo ho vyžadují vnitrostátní předpisy.

Analytické výkony:

Analytická specifičnost:

Specifická 81% byla zjištěna u 47 sér pacientů s jinými parazitárními infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s toxokarózou, filariózami a strongyloidózou.

U suprafyziologických koncentrací hemoglobinu, lipidů nebo bilirubinu v séru doplněných interferenty nebyla pozorována žádná pozitivní ani negativní interference.

Přesnost:

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 duplicitní vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,108	1,584	0,121	1,754
Standardní odchylka (absorbance)	0,008	0,082	0,020	0,111
Koeficient odchylky (%)	7,4	5,2	16,7	6,3

Klinické výkony:

Diagnostická citlivost:

Citlivost 97% byla zjištěna u 38 sér pacientů trpících anisakidózou trávicího traktu a/nebo alergickou anisakidózou.

Diagnostická specifičnost:

Specifická 97% byla zjištěna u 180 sér dárců krve (Švýcarsko). Specifická 96% byla zjištěna u 98 sér pacientů infekčního oddělení (Švýcarsko). Specifická 86% byla zjištěna u 43 sér pacientů s podezřením na anisakidózu, u nichž však bylo toto onemocnění s jistotou vyloučeno.

Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedených populací byly zjištěny hodnoty PPV 77% a NPV 99%.

Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 180 švýcarských dárců krve a v 98 sérech ze švýcarského infekčního oddělení činí očekávaná hodnota indexu 0,34. V zasažené populaci 47 sér pacientů trpících anisakidózou činí očekávaná hodnota indexu 3,71.

Incidenty:

Každý závažný incident, k němuž v souvislosti s tímto prostředkem dojde, je nutné oznámit výrobci a příslušnému orgánu členského státu, v němž je uživatel anebo pacient usazen.

Omezení:

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

Reference:

Mazzucco, M., Raia, D.D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F. and Casuccio, A. (2018) Validation of an *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. Plos one 13.

Kochanowski, M., Gonzalez-Munoz, M., Gomez-Morales, M.A., Gottstein, B., Dabrowska, J., Rozycki, M., Cencek, T., Muller, N. and Boubaker, G. (2019) Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG ELISA. Experimental Parasitology 197, 9-15.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

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

