

Acanthocheilonema viteae IgG ELISA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu filariózy u člověka

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



Návod k použití pro produkt č. 9400
EC reg. č.: H-CH/CA01/IVD/01755 - UDI-DI: 07640158219409



Předpokládané použití:

Sada *Acanthocheilonema viteae* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena pro kvantitativní detekci IgG protilátek proti různým filiárním nematodám v lidském séru (bancroftovská a malajská filarióza, loaóza, onchocerkóza a mansonelóza. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

Pozadí:

Filarióza je způsobena dospělými šroubovicovými červy, kteří neustále produkují mikroskopicky drobné potomstvo. Většina infekcí na celém světě je způsobena vlasovci *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* a *Brugia timori*. Lidé mohou být infikováni z osoby na osobu bodnutím komára. Dospělý červ žije převážně v lymfatických cévách a samičky produkují po spáření miliony mikrofilárií, které cirkulují krevním oběhem a tím umožňují nákazu komárů po bodnutí. Většina infikovaných lidí nevykazuje jednoznačné symptomy. Avšak v některých případech se u nakažených lidí vytvoří lymfedém, elefantiáza nebo otok. Diagnóza aktivní infekce je založena na identifikaci mikrofilárií v krvi mikroskopickou zkouškou a pozitivním výsledkem sérologického testu.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách zcitlivěných somatickými antigeny *Acanthocheilonema viteae* od dospělých žen. 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 *Acanthocheilonema viteae* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	9400-01	Oddělitelné proužky ELISA destičkách zcitlivěných somatickými antigeny <i>Acanthocheilonema viteae</i>	96	destiček
DILB	9400-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	9400-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	9400-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	9400-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	9400-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), 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 2-8°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:

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 9400-01 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 9400-02 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 2-8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Kontrolní sérum: Zředte 10 µl kontrolního séra 9400-06 až -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 9400-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9400-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9400-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředěte 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 9400-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředěte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N _a N ₃)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9400-02	0,1%	0,02%
Vyplachovací roztok (10 x)	9400-03	0,05%	/
Tlumicí enzym	9400-04	0,01%	/
Kontrolní sérum (20 x)	9400-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9400-09	0,1%	/

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

- Zastavovací roztok 9400-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9400-06 až -08) pochází z králíků.
- 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 použijte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodostičky 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: 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 zaklepaním 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 37°C.

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, oťřete 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 > 19% A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 10% A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

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

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9400-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů filariózy 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 *Acanthocheilonema viteae* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než **1,0**. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu *Acanthocheilonema viteae* 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:

Specifita 69 % byla zjištěna u 75 sér pacientů s jinými parazitárními infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s askariózou, trichinelózou, ankylostomózou, fasciolózou a cystickou echinokokózou.

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 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

Následující hodnoty nelze stanovit, protože pro tuto analýzu není k dispozici žádný certifikovaný referenční materiál:

- Analytická citlivost (meze detekce a kvantifikace)
- Přesnost
- Pravdivost
- Rozsah měření
- Linearita

Klinické výkony:

Diagnostická citlivost:

Citlivost 95% byla zjištěna u 22 sér pacientů trpících filariózami (u pacientů s mikrofiláriemi a/nebo s pozitivní sérologií jinými technikami a s epidemiologickým a klinickým pozadím filarióz).

Diagnostická specifičnost:

Specifita 98% byla zjištěna u 180 sér dárců krve (Švýcarsko).

Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedených populací byly zjištěny hodnoty PPV 98% a NPV 99%.

Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 99 švýcarských dárců krve a ve 100 sérech ze švýcarského infekčního oddělení činí očekávaná hodnota indexu 0,38. V zasažené populaci 12 sér pacientů trpících filariózami činí očekávaná hodnota indexu 1,87.

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:

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.

Gobbi, F., Tamarozzi, F., Buonfrate, D., Rodari, P., Tais, S. and Bisoffi, Z. (2019) Laboratory Parameters after Treatment for Loa loa and Mansonella perstans: The Experience of a Single Referral Center for Tropical Diseases in a Non-Endemic Area. Am. J. Trop. Med. Hyg. **100** : 914-920.

Gobbi, F., Buonfrate, D., Boussinesq, M., Chesnais, C.B., Pion, S. D., Silva, R. et al. (2020) Performance of two serodiagnostic tests for loiasis in a Non-Endemic area. Plos Negl. Trop. Dis. **14** : e0008187.



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

