

# Anisakidae IgG ELISA

## Enzymový imunotest na diagnózu ľudskej tráviacej anisakidózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre artikel č. 9800  
Reg. zn. CE: CH-202201-0009 - UDI-DI: 07640158219805



### Plánované použitie:

Súprava Bordier *Anisakidae* IgG ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti parazitom čeľade *Anisakidae* v ľudskom sére. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

### Pozadie:

Anisakidóza je celosvetová helmintická zoonóza spôsobená niektorými nematódami morských rýb z čeľade *Anisakidae*. Človek sa môže nakaziť požitím surového alebo nedostatočne tepelne upraveného kontaminovaného rybieho mäsa. Dospelé červy nematód anisakid sa zdržiavajú v tráviacom trakte morských cicavcov (konečných hostiteľov). Po embryonácii vo vode vajíčka vypustia do vody napadajúce larvy L3, ktoré sú prehltnuté planktonickým kôrovcom (medzihostiteľ). Po konzumácii rybami alebo hlavoňkami (paratenickými hostiteľmi) larvy migrujú do vnútorností a peritoneálnej dutiny, takže sa už ďalej nevyvíjajú. Po prehltnutí morskými cicavcami sa larvy vyvinú na dospelé červy. Človek je ako náhodný hostiteľ parazitickou slepou uličkou. Väčšina infikovaných osôb nevykazuje žiadne príznaky. V niektorých prípadoch sa však symptómy objavujú v žalúdočnom štádiu (bolesť v oblasti epigastria, nevoľnosť a zvracanie), črevnom (bolesť brucha, nevoľnosť, zvracanie a hnačka) alebo v alergickom štádiu (žihľavka, svrbenie, angioedém a bronchospazmus). Diagnóza je založená na príznakoch a symptómoch plus anamnéze expozície a pozitívnom výsledku sérologického testovania.

### Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitivovaných larválnymi antigénmi vylučovanými / vylúčenými (excreted/secreted - E/S) *Anisakidae*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalického fosfatázy. Druhý premývací krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalického fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Anisakidae* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodoštičiek ELISA. Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

### Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

<b>WELL</b>	9800-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi E/S <i>Anisakidae</i>	96	jamky
<b>DILB</b>	9800-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
<b>WASH</b>	9800-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9800-04	Enzymový tlmivý roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9800-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9800-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9800-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9800-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
<b>CONJ</b>	9800-09	Proteín A - konjugát alkalického fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
<b>SUBS</b>	9800-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

### Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8°C (preprava pri teplote okolia), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

### Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

### Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

**Jamky ELISA:** otvorte hliníkovú tašku 9800-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

**Tlmivý riediaci roztok:** rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9800-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

**Premývací roztok:** rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9800-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickkej fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Kontrolné séra:** rozriedte 10 µl kontrolných sér 9800-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Konjugát:** rozriedte konjugát 9800-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

**Roztok substrátu:** rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9800-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9800-04 (1 tableta v 2,5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

**Zastavovací roztok:** použite reagent 9800-05, nezriedený.

### Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladuje pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu. Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

### Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9800-02	0,1%	0,02%
Premývací roztok (10 x)	9800-03	0,05%	/
Premývací roztok	9800-04	0,01%	/
Kontrolné séra (20 x)	9800-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9800-09	0,1%	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 9800-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9800-06 až -08) sú z králikov.
- Zaochádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentami a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.
- Zabráňte znehodnoteniu mikrojamek mechanickým pôsobením (špičky/kužele, dýzy).
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

## Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

### Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

### Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorky bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

### Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

### Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

### Krok 5: Meranie absorbcie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

## Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorpcie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorpcia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabej pozitívnej kontrolnej vzorky > 9% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 8% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9800-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov anisakidózy a zdravým ľudským sérom. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Anisakidae** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Anisakidae** považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať potvrdzovací test (najčastejšie western blot), ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštátnymi predpismi.

## Analytické výkony:

### Analytická špecifickosť:

Presnosť s výškou 81 % sa zistila v 47 sérach pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa vyskytuje hlavne u pacientov s toxokarózou, filariózami a strongyloidózou.

Pri suprafyziologických koncentráciách hemoglobínu, lipidov alebo bilirubínu v sérach doplnených interferentmi sa nepozorovala žiadna pozitívna ani negatívna interferencia.

### Precíznosť:

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0,109	1,690	0,121	1,754
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0,011	0,056	0,017	0,102
Variačný koeficient (%)	9,7	3,3	14,2	5,8

Tieto výkony nemožno hodnotiť, pretože pre túto analýzu neexistuje certifikovaný referenčný materiál:

- analytická citlivosť (limity detekcie a kvantifikácie),
- presnosť,
- pravdivosť,
- rozsah merania,
- linearita.

## Klinické výkony:

### Diagnostická citlivosť:

Citlivosť 97 % sa zistila v 38 sérach pacientov trpiacich tráviacou alebo alergickou anisakidózou.

### Diagnostická špecifickosť:

Presnosť s výškou 97 % sa zistila v 180 sérach darcov krvi (švajčiarskych). Presnosť s výškou 96 % sa zistila v 98 sérach pacientov infekčného oddelenia (Švajčiarsko). Presnosť s výškou 86 % sa zistila v 43 sérach pacientov s podozrením na anisakidózu, u ktorých však bolo toto ochorenie s určitosťou vylúčené.

### Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota:

Pri vyššie uvedených populáciách sa zistila PPV 77% a NPV 99%.

### Očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie:

V normálnej populácii 180 švajčiarskych darcov krvi a 98 sér zo švajčiarskeho infekčného oddelenia je očakávaná hodnota indexu 0,34. V postihnutej populácii 47 sér pacientov trpiacich anisakidózou je očakávaná hodnota indexu 3,71.

## Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

## Obmedzenia:

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje. U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

## Odkazy na použitú literatúru:

Mazucco, 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 SA**  
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

