



FILARIASIS ANTIGEN Og4C3 ELISA

ELISA Kit for the detection and quantification of *Wuchereria bancrofti* Antigen

English

INTRODUCTION

Lymphatic filariasis in man is caused by infection with the filarial parasites *W. bancrofti* and *Brugia* spp. These parasites inhabit the lymphatics and cause disease by obstructing and inducing secondary inflammatory changes in lymph vessels. The disease is transmitted by mosquitoes, which ingest microfilariae during feeding on an infected host and transmit the infective larvae to other individuals at a subsequent feeding. Worldwide, more than 90 million people are affected by lymphatic filariasis. Most live in the humid tropics in areas such as Africa (south of the Sahara), Egypt, the Indian subcontinent, South-East Asia, China, Madagascar, Papua New Guinea, the Pacific Islands, the Philippines and Central and South America (World Health Organisation, 1984).

Acute symptoms of lymphatic filariasis primarily involve lymphadenitis and lymphangitis. Recurrent fever and pain in affected lymph nodes are the usual sequelae. In some patients, symptoms may be less specific, with only fever and malaise present. Some infected individuals are asymptomatic. Lymphoedema becomes apparent after repeated episodes of lymphadenitis, and swelling of the limbs or scrotum may occur. Lymphoedema and elephantiasis may affect the leg, arm and scrotum and occasionally the vulva and breasts, but they are usually restricted to the leg below the knee. With brugian filariasis, more severe inflammatory changes are noted in the lymphatics, whereas bancroftian filariasis has a more extensive swelling of the entire limb.

Filariasis in previously unexposed migrants to an endemic area has a similar clinical course, but can be manifested earlier (6 - 8 weeks) than the normal 7 - 8 month clinical incubation period. Microfilaraemia is an uncommon finding in these migrant individuals, reflecting an intense immunological reaction to the parasite (Partono et al., 1977).

INTENDED USE

The TropBio Filariasis Antigen Og4C3 ELISA was developed for the detection of *Wuchereria bancrofti* (Bancroftian filariasis) circulating filarial antigen (CFA) using whole blood, plasma, serum or dried blood samples (DBS).

This assay can be used as a diagnostic tool for clinical cases, screening or for epidemiological surveys to determine the prevalence of disease in study sites based on the detection of *W. bancrofti* CFA in populations. The assay is increasingly used as a tool to assess and monitor the prevalence of disease after rounds of mass drug administration (MDA). In low prevalence settings, the interpretation of ELISA result can be modified to focus on the low antigen readings and define an appropriate cut off value as an alternative to using the "titre group method" by Moore and Copeman (1990).

CONTENTS OF THE KIT

	Code	KF1 (1 plate)	KF2 (5 plates)
Microwell plates (Og4C3)	FGMW	1	5
Sample Diluent (1x)	FGSD	30 mL	120 mL
Antibody and Conjugate Diluent (1x)	FGCD	30 mL	100 mL
Standard Antigens (1-7)	FGPC	-	0.8 mL
Standard Antigen No. 7 (Positive Control)	FGPC	0.6 mL	-
Standard Antigen No. 1 (Negative Control)	FGNC	0.6 mL	-
Rabbit anti-onchocerca antibody (120x)	FGAB	0.07 mL	0.35 mL
Anti-rabbit HRP-conjugate (120x)	FGPO	0.07 mL	0.35 mL
TMB Substrate Concentrate (20x)	FGSC	0.5 mL	1.8 mL
Substrate Buffer (1x)	FGSB	7.0 mL	30.0 mL
Stopping Solution (1x)	FGSS	7.0 mL	30.0 mL
Wash Buffer (20x)	FGPT	100 mL	250 mL

Store kit at 2-8°C. Store the positive control frozen using the instructions below. Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Distilled water, micropipettes and tips, clean glassware or plastic containers for solutions, humid chamber, ELISA washer, ELISA plate reader to read absorbances at a single wavelength of 450nm or at dual wavelength of 450nm and 620nm or automated ELISA systems.

PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. Do not use after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix reagents from different batch numbers. Thiomerosal preservative added to some components is a poison. Exercise caution when handling these components. The stopping solution is corrosive. Avoid contact with skin, eye and mucous membranes. Ensure all dilution containers are clean before use. Avoid exposure of the substrate to light. Treat all clinical and control material as though potentially infectious and dispose of in accordance with local operating regulations. For further information, please refer to the Safety Data Sheet. Reagents should not be used after the expiry date shown on the label.

INSTRUCTIONS FOR USE

METHOD FOR SERUM OR PLASMA SAMPLES

All steps carried out at room temperature. Ensure that all reagents and the microwell plates are at room temperature before use. **Quantities indicated below refer to the use of ONE PLATE. Calculate the required reagent depending on the wells being used.** To prepare wash buffer, dilute 25mL of Wash Buffer 20x concentrate to 475mL distilled water. Wash Buffer 1x can be stored at 2-8°C for up to one week.

The boiling treatment is optional. See Notes on the Assay.

Sample Preparation

To prepare samples (serum or plasma), add 100µL of test sample to 300µL of sample diluent in a suitable tube for boiling eg. Eppendorf microcentrifuge tubes (piece the lid with a fine needle to allow air to escape during boiling). Do not boil or dilute standards 1-7.

Place the tubes into a 100°C boiling water bath for five minutes. After boiling, centrifuge the samples at 2,000g for 15 minutes (racked tubes) or 10,000g for five minutes (Eppendorf tubes). The clear supernatant fluid contains the heat stable antigen.

1. Add 50µL aliquots of boiled sample supernatant fluid to a test well. Up to 80 samples can be tested per plate.
Add 50µL of Standard Antigens (1-7) and conjugate control (use sample diluent) in duplicates using two microwell strips. Refer to Figure 1 for the plate layout diagram.
2. Incubate by placing the plate in a humid container for 60 minutes at 37°C. (Note: using an overnight incubation will result in high OD readings that will not produce a typical standard curve).
3. Wash the plate three times with wash buffer, invert and tap gently to remove residual buffer.

4. Dilute 50uL of the anti-Onchocerca antibody (Yellow cap) to 6 mL of antibody diluent (Blue solution). Mix thoroughly. Add 50 uL of diluted rabbit-anti Onchocerca antibody to all wells. Place the plate in a humidity chamber and incubate for 45 minutes at 37°C .
6. Wash the plate three times as before.
7. Dilute 50 uL of Anti-rabbit HRPO conjugate (Purple cap) to 6 mL of antibody diluent. Mix thoroughly. Add 50 uL of diluted conjugate to all wells. Place in a humidity chamber and incubate for 45 minutes at 37°C.
8. Wash the plate three times as before.
9. Prepare the substrate by diluting 300uL of TBM substrate concentrate to 5700uL of Substrate Buffer. Mix thoroughly. Add 50uL to each well and incubate for 15 minutes in the dark at room temperature.
10. Stop the reaction by adding 50uL of Stopping Solution to each well (blue colour will turn yellow).
11. Read the plate using a plate reader at 450 nm, or dual wavelengths of 450/620 nm.

METHOD FOR FILTER PAPER SAMPLES

Note: This kit does not contain 1% hydrogen peroxide (H2O2). You are required to prepare the solution in Step 5 of the method. Filter paper discs can be ordered separately. Note that using different types of filter paper other than the Tropbio filter paper discs may give different results due to various paper thickness, size, make and pre-treatments.

1. **Preparation of filter paper samples:** Cut three protrusions from the filter paper disk and add them to a suitable tubes eg. 2 mL Eppendorf microtubes. Protrusions can be cut in half to allow the disks to reach the bottom of the tubes if not using 2mL tubes.
Add 200 uL of sample diluent to each tube and leave the blood samples to elute overnight at 2-8°C. The next morning, place the tubes into a 100°C water bath for five minutes
After heating in the water bath, centrifuge the samples at 2,000 g for 15 minutes. The supernatant contains the heat stable antigen.
2. Add 50uL aliquots of boiled sample supernatant fluid to a test well. Up to 80 samples can be tested per plate.
Add 50uL of Standard Antigens 1-7 (do not boil) and conjugate control (use sample diluent) in duplicates using two strips of a plate. Refer to the plate layout diagram on Page 4.
3. Incubate by placing the plate in a humid container for 60 minutes at 37°C . (*Note: using an overnight incubation will result in high OD readings that will not produce a typical standard curve*).
4. Wash the plate three times with wash buffer, invert and tap gently to remove residual buffer.
5. Prepare a 1% hydrogen peroxide solution for ONE plate by adding 400uL of hydrogen peroxide (~30%) to 12mL of 1x wash buffer.
6. Add 50uL of the 1% hydrogen peroxide solution to all test wells and incubate for 10 minutes at room temperature. Do not add 1% hydrogen peroxide to standards and controls.
7. Wash the plate three times with wash buffer, invert and tap gently to remove residual buffer.
8. Dilute 50uL of the anti-Onchocerca antibody (Yellow cap) to 6 mL of antibody diluent (Blue solution). Mix thoroughly. Add 50 uL of diluted rabbit anti-onchocerca antibody to all wells. Place the plate in a humidity chamber and incubate for 45 minutes at 37°C.
9. Wash the plate three times as before.
10. Dilute 50 uL of Anti-rabbit HRPO conjugate (Purple cap) to 6 mL of antibody diluent. Add 50 uL of diluted conjugate to all wells. Place in the plate in a humidity chamber and incubate for 45 minutes at 37°C
11. Wash the plate three times as before.
12. Prepare the substrate by diluting 300uL of TBM substrate concentrate to 5700uL of Substrate Buffer. Mix thoroughly. Add 50uL to each well and incubate for 15 minutes in the dark at room temperature.
13. Stop the reaction by adding 50uL of Stopping Solution to each well (blue colour will turn yellow).
14. Read the plate using a plate reader at 450 nm, or dual wavelengths of 450/620 nm.

Figure 1: ELISA plate layout

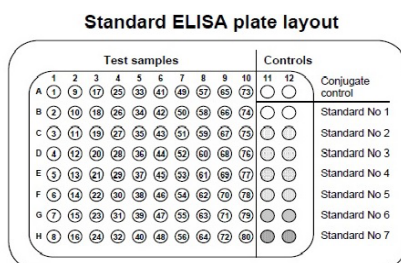
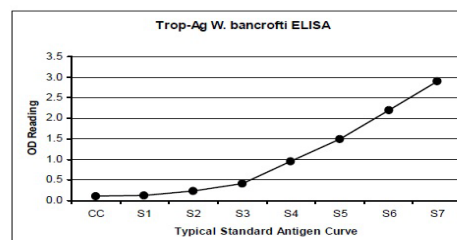


Figure 2: Typical Standard Curve for quantification.



READING AND INTERPRETATION OF RESULTS

Titre Group Interpretation by Moore and Copeman (1990)

Read the microwell plate at dual wavelength in a compatible ELISA plate reader, blanked against air. For the test results to be accepted, standard 1 (Negative control) and Standard 7 (Positive Control) must read as follows:

- Standard 1 OD <0.2
- Standard 7 OD >2.0

A typical standard curve for the seven standard antigens is shown below. These values are used to allocate the test samples into one of eight titre groups according to the table shown below.

Using the seven standard samples it is possible to allocate the test samples into eight titre groups according to the following table. The titre groups are very useful for population studies. Moore and Copeman (1990) allocated antigen units to the seven controls.

Table 1

Allocation of samples to titre groups				
Titre Group	Absorbance	Standard No.	Antigen units	Average OD values
1	< Control sample No. 1	1	<10	0.059
2	< Control sample No. 2	2	32	0.335
3	< Control sample No. 3	3	128	0.556
4	< Control sample No. 4	4	512	0.992
5	< Control sample No. 5	5	2,048	1.520
6	< Control sample No. 6	6	8,192	2.243
7	< Control sample No. 7	7	32,000	2.809
8	> Control sample No. 7			>3.0

Note: Standards 1-7 results shall be within range of a linear Standard Curve. Refer to the Average OD values for each standard.

Standard 1 control sample does not contain any antigen (<OD 0.2). Test samples allocated in titre group 1 can be considered non-reactors (negative). Samples allocated in titre group 2 are equivocal reactors (grey area) and the test may be repeated. Test samples allocated in titre groups 3-7 are positive reactors containing circulating filarial antigen (CFA).

A previous study in New Guinea, Ghana, the Philippines and India this group represented up to 10% of the test samples. None of the Australian samples from an uninfected population were allocated to group 3. It is very likely that samples allocated to group 3 are reacting in the assay. Further data will be collected on this group to determine their status.

Recommended Low Prevalence Interpretation Method

A low prevalence interpretation is introduced to this assay due to the significant impacts of mass drug administration (MDA) aimed at eliminating filariasis. This method applies to low prevalence studies where antigen levels had significantly decreased, close to the end-point, after repeated MDA where antigen levels are below Titre Group 3.

Use Standard 2 as the reference for determining a cut-off value to define a low positive sample and a negative sample. If Standard 2 OD reading is within +/- 10% of OD 0.35, and the curve is linear or within range of the average values on Table 1, this value shall be used as the cut-off value for result interpretation. If Standard 2 is not within range of OD 0.35, a default cut-off value of OD 0.35 shall be used.

The default cut-off value of OD 0.35 was determined using 300 non-endemic serum samples from Australia. The cut-off value was determined by calculating the mean OD +3 Standard Deviation. Standard 2 is expected to give a value of OD 0.35 at 450/620nm wavelength but may vary between assays.

Studies of serum samples of uninfected Australian residents

Serum:	Samples	Mean	Standard Deviation
Study 1	303	OD 0.149	0.019
Study 2	66	OD 0.063	0.129

Dried Blood Sample on filter paper :

Study 1	100	OD 0.149	0.045
---------	-----	----------	-------

NOTES ON THE ASSAY

This kit has been designed to be used in conjunction with serum or plasma samples. Samples are boiled in an EDTA solution and centrifuged. This treatment has been shown to dissociate antigen/antibody complexes. The target antigen is heat stable and is retained in the supernatant. Following treatment there can be up to a fourfold rise in antigen titre. However, the boiling treatment can be optional, a study by Reeve, D and Melrose W, 2014 and in-house studies (unpublished) found that the boiling treatment may not significantly increase the sensitivity of the assay however, the use of an appropriate dilution may nullify the difference if samples are not treated by boiling.

For filter paper blood samples, a 1% hydrogen peroxide (H₂O₂) solution step is required to reduce the interference of endogenous peroxidase released by the haemolysis of red blood cells on the filter paper. Test samples can be handled in a 96 well microtitre format using racked tubes. The racks are modified to allow them to be placed into a boiling water bath. Subsequently the racks can be centrifuged in a rotor with microtitre buckets at approximately 2,000 g for 15 minutes.

The 96 well microtitre plates supplied are coated with a monoclonal antibody (Og4C3) which has been shown to specifically recognise only *Wuchereria bancrofti* antigen in human sera. Og4C3 will not cross react with human sera infected with *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *Strongyloides stercoralis*, *Draconculus medinensis* or *Ascaris lumbricoides*. The cattle parasite. *Onchocerca gibsoni* is recognised by this monoclonal antibody and is used to standardise the ELISA.

The indicator antibody is produced by vaccinating rabbits with purified *Onchocerca gibsoni* antigen and the conjugate is a goat anti-rabbit globulin conjugated to horseradish peroxidase. The addition of TMB substrate solution produces a blue colour during development of positive samples, a reaction which is stopped by the addition of Stopping solution in which changes the blue colour to yellow.

A humid chamber for incubating plates can be prepared by laying a few layers of wet laboratory tissue flat at the bottom of a plastic box with a lid. Plates can be placed on top of the wet laboratory tissue and incubated in a 37°C incubator or water bath.



FILARIASIS ANTIGEN Og4C3 ELISA

ELISA Kit for the detection and quantification of *Wuchereria bancrofti* Antigen

Spanish

INTRODUCCIÓN

La filariasis linfática en el hombre es causada por infección con los parásitos filariales *W. bancrofti* y *Brugia* spp. Estos parásitos habitan los linfáticos y causan enfermedades al obstruir e inducir cambios inflamatorios secundarios en los vasos linfáticos. La enfermedad se transmite a través de mosquitos, que ingieren microfilarias durante la alimentación de un huésped infectado y transmiten las larvas infectadas a otros individuos en una alimentación posterior. En todo el mundo, más de 90 millones de personas se ven afectadas por la filariasis linfática. La mayoría vive en los trópicos húmedos en zonas como África (al sur del Sahara), Egipto, el subcontinente indio, el sudeste asiático, China, Madagascar, Papúa Nueva Guinea, las islas del Pacífico, Filipinas y Centro y Sudamérica (Organización Mundial de la Salud, 1984).

Los síntomas agudos de la filariasis linfática involucran principalmente linfadenitis y linfangitis. La fiebre recurrente y el dolor en los ganglios linfáticos afectados son las secuelas habituales. En algunos pacientes, los síntomas pueden ser menos específicos, presentándose solo fiebre y malestar. Algunas personas infectadas son asintomáticas. El linfedema se hace evidente tras episodios repetidos de linfadenitis, y puede aparecer hinchazón de las extremidades o del escroto. El linfedema y la elefantiasis pueden afectar a la pierna, el brazo y el escroto, y ocasionalmente a la vulva y los pechos, pero normalmente se limitan a la pierna por debajo de la rodilla. En la filariasis brugiana, se observan cambios inflamatorios más graves en los linfáticos, mientras que la filariasis de Bancroftian presenta una hinchazón más extensa de toda la extremidad.

La filariasis en migrantes previamente no expuestos a una zona endémica tiene un curso clínico similar, pero puede manifestarse antes (6 - 8 semanas) que el periodo clínico normal de incubación de 7 a 8 meses. La microfilaremia es un hallazgo poco común en estos individuos migratorios, reflejando una intensa reacción inmunológica al parásito (Partono et al., 1977).

USO PREVISTO

El ELISA del antígeno Tropbio Filariasis Og4C3 fue desarrollado para la detección del antígeno filarial *circulante (CFA) de Wuchereria bancrofti* (filariasis) utilizando sangre total, plasma, suero o muestras de sangre seca (DBS).

Este ensayo puede utilizarse como herramienta diagnóstica para casos clínicos, cribado o para encuestas epidemiológicas que determinen la prevalencia de la enfermedad en los centros de estudio basándose en la detección de *W. bancrofti* CFA en poblaciones. El ensayo se utiliza cada vez más como herramienta para evaluar y monitorizar la prevalencia de la enfermedad tras rondas de administración masiva de medicamentos (MDA). En entornos de baja prevalencia, la interpretación del resultado de ELISA puede modificarse para centrarse en las lecturas bajas de antígenos y definir un valor de corte adecuado como alternativa al uso del "método del grupo título" de Moore y Copeman (1990).

CONTENIDO DEL KIT

	Código	KF1 (1 matrícula)	KF2 (5 matrículas)
Placas de micropozos (Og4C3)	FGMW	1	5
Diluyente de muestra (1x)	FGSD	30 mL	120 mL
Anticuerpos y diluyente conjugado (1x)	FGCD	30 mL	100 mL
Antígenos estándar (1-7)	FGPC	-	0,8 mL
Antígeno estándar nº 7 (Control positivo)	FGPC	0,6 mL	-
Antígeno estándar nº 1 (Control negativo)	FGNC	0,6 mL	-
Anticuerpo anti-oncocerca del conejo (120x)	FGAB	0,07 mL	0,35 mL
Anti-conejo HRP-conjugado (120x)	FGPO	0,07 mL	0,35 mL
TMB Concentrado de sustrato (20x)	FGSC	0,5 mL	1,8 mL
Buffer de sustrato (1x)	FGSB	7,0 mL	30,0 mL
Solución de parada (1x)	FGSS	7,0 mL	30,0 mL
Buffer de lavado (20 veces).	FGPT	100 mL	250 mL

Guarda el kit a 2-8°C. Guarda el control positivo congelado siguiendo las instrucciones siguientes. Las fechas de caducidad están claramente marcadas en cada componente del kit y en la caja. Las fechas de caducidad no cambian una vez abiertas.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

Agua destilada, micropipetas y puntas, cristalería limpia o recipientes de plástico para soluciones, cámara húmeda, arandela ELISA, lector de placas ELISA para leer absorbancias a una sola longitud de onda de 450nm o a doble longitud de onda de 450nm y 620nm, o sistemas ELISA automatizados.

PRECAUCIONES

Solo para uso diagnóstico in vitro. No lo use después de la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta. Si el embalaje protector está dañado, contacta con tu distribuidor local y pide un reemplazo. No mezcles reactivos de diferentes números de lote. El conservante de tiomersal añadido a algunos componentes es un veneno. Ten cuidado al manipular estos componentes. La solución de parada es corrosiva. Evita el contacto con la piel, los ojos y las mucosas. Asegúrate de que todos los recipientes de dilución estén limpios antes de usarlos. Evita la exposición del sustrato a la luz. Tratar todo material clínico y de control como si fuera potencialmente infeccioso y deshacerse de ello conforme a las normativas locales de explotación. Para más información, consulte la Hoja de Datos de Seguridad.

INSTRUCCIONES DE USO

MÉTODO PARA MUESTRAS DE SUERO O PLASMA

Todos los pasos se realizan a temperatura ambiente. Asegúrate de que todos los reactivos y las placas del micropozo estén a temperatura ambiente antes de su uso. **Las cantidades indicadas a continuación se refieren al uso de UNA PLACA. Calcula el reactivo necesario según los pozos que se utilicen.** Para preparar el tampón de lavado, diluye 25 mL de tampón de lavado 20x concentrado hasta 475 mL de agua destilada. El Wash Buffer 1x se puede almacenar a 2-8°C durante hasta una semana.

El tratamiento de hervido es opcional. Ver Notas sobre el ensayo.

Preparación de muestras

Para preparar muestras (suero o plasma), añadir 100 µL de muestra de prueba a 300 µL de diluyente en un tubo adecuado para hervir, por ejemplo, Tubos de microcentrifuga Eppendorf (perforan la tapa con una aguja fina para permitir que el aire escape durante la hervición). No hiervas ni diluyas los estándares 1-7.

Coloca los tubos en un baño maria hirviendo a 100°C durante cinco minutos. Después de hervir, centrifugar las muestras a 2.000g durante 15 minutos (tubos en trasvasas) o 10.000g durante cinco minutos (tubos Eppendorf). El fluido supernadante transparente contiene el antígeno termoestable.

1. Añadir 50 µL de fluido sobrenadante hervido a un pozo de prueba. Se pueden analizar hasta 80 muestras por placa.
Añadir 50 µL de antígenos estándar (1-7) y conjuga el control (usa diluyente de muestra) en duplicados usando dos tiras de micropozo. Consulte la Figura 1 para el diagrama de disposición de placas .
2. Incubar colocando la placa en un recipiente húmedo durante 60 minutos a 37°C. (*Nota: usar una incubación nocturna resultará en lecturas altas de OD que no producirán una curva estándar típica*).
3. Lava la placa tres veces con el buffer de lavado, invierte y golpea suavemente para eliminar el buffer residual.
4. Diluir 50 µL del anticuerpo anti-Onchocerca (tapa amarilla) a 6 mL de diluyente de anticuerpos (solución azul). Mezcla bien. Añade 50 µL de anticuerpo diluido conejo-anti-Onchocerca a todos los pozos. Coloca la placa en una cámara de humedad e incuba durante 45 minutos a 37°C.
6. Lava el plato tres veces como antes.
7. Diluir 50 µL de conjugado anticonejo HRPO (tapa morada) a 6 mL de diluyente de anticuerpos. Mezcla bien. Añade 50 µL de conjugado diluido a todos los pozos. Colócalo en una cámara de humedad e incuba durante 45 minutos a 37°C.
8. Lava el plato tres veces que antes.
9. Preparar el sustrato diluyendo 300 µL de concentrado de sustrato TBM a 5700 µL de tampón de sustrato. Mezcla bien. Añade 50 µL a cada pozo y incuba durante 15 minutos a oscuridad a temperatura ambiente.
10. Detener la reacción añadiendo 50 µL de solución de parada a cada pozo (el color azul se volverá amarillo).
11. Lee la placa usando un lector de placas a 450 nm, o longitudes de onda duales de 450/620 nm.

MÉTODO PARA MUESTRAS DE PAPEL FILTRO

Nota: Este kit no contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1%. Debes preparar la solución en el Paso 5 del método. Los discos de papel filtro pueden encargarse por separado. Ten en cuenta que usar diferentes tipos de papel filtro distintos a los discos de papel filtrante Tropbio puede dar resultados distintos debido a diferentes grosores, tamaños, fabricación y pretratamientos.

1. **Preparación de muestras de papel de filtro:** Cortar tres protuberancias del disco de papel de filtro y añadirlas a tubos adecuados, por ejemplo, microtubos de Eppendorf de 2 mL. Las protuberancias pueden cortarse por la mitad para permitir que los discos lleguen al fondo de los tubos si no se utilizan tubos de 2 mL.
Añade 200 µL de diluyente de muestra a cada tubo y deja que las muestras de sangre se eluyen durante la noche a 2-8°C. A la mañana siguiente, coloca los tubos en un baño maria a 100°C durante cinco minutos.
Después de calentar en el baño maria, centrifuga las muestras a 2.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante contiene el antígeno termoestable.
2. Añadir 50µL de fluido sobrenadante hervido a un pozo de prueba. Se pueden analizar hasta 80 muestras por placa.
Añadir 50µL de antígenos estándar 1-7 (no hervir) y conjuga el control (usa diluyente de muestra) en duplicados usando dos tiras de una placa. Consulte el diagrama de disposición de las placas en la página 4.
3. Incubar colocando la placa en un recipiente húmedo durante 60 minutos a 37°C. (*Nota: usar una incubación nocturna resultará en lecturas altas de OD que no producirán una curva estándar típica*).
4. Lava la placa tres veces con buffer de lavado, invierte y golpea suavemente para eliminar el buffer residual.
5. Preparar una solución de peróxido de hidrógeno al 1% para UNA placa añadiendo 400 µL de peróxido de hidrógeno (~30%) a 12mL de 1x wash buffer.
6. Añadir 50 µL de la solución de peróxido de hidrógeno al 1% a todos los pozos de prueba e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. No añadas peróxido de hidrógeno al 1% a los estándares y controles.
7. Lava la placa tres veces con buffer de lavado, invierte y golpea suavemente para eliminar el buffer residual.
8. Diluir 50 µL del anticuerpo anti-Onchocerca (Yellow cap) a 6 mL de diluyente de anticuerpos (solución azul). Mezcla bien. Añade 50 µL de anticuerpo anti-onchocerca diluido en todos los pozos. Coloca la placa en una cámara de humedad e incuba durante 45 minutos a 37°C.
9. Lava el plato tres veces que antes.
10. Diluir 50 µL de conjugado anticonejo HRPO (tapa morada) a 6 mL de diluyente de anticuerpos. Añade 50 µL de conjugado diluido a todos los pozos. Colócala en la placa en una cámara de humedad e incuba durante 45 minutos a 37°C.
11. Lava el plato tres veces que antes.
12. Prepara el sustrato diluyendo 300 µL de concentrado de sustrato TBM a 5700 µL de tampón de sustrato. Mezcla bien. Añade 50 µL a cada pozo y incuba durante 15 minutos a oscuridad a temperatura ambiente.
13. Detener la reacción añadiendo 50 µL de solución de parada a cada pozo (el color azul se volverá amarillo).
14. Lee la placa usando un lector de placas a 450 nm, o longitudes de onda duales de 450/620 nm.

Figura 1: Disposición de placas ELISA

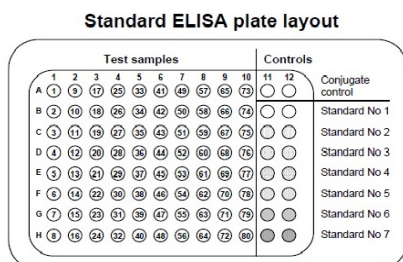
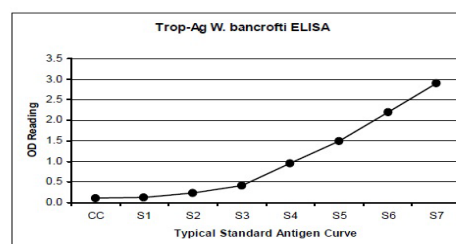


Figura 2: Curva estándar típica para cuantificación.



LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación del grupo de títulos por Moore y Copeman (1990)

Lee la placa de micropozo a doble longitud de onda en un lector de placas ELISA compatible, bloqueada contra el aire. Para que se acepten los resultados de la prueba, el estándar 1 (control negativo) y el estándar 7 (control positivo) deben leerse como sigue:

Estándar 1 OD <0.2
7 OD estándar >2.0

A continuación se muestra una curva estándar típica para los siete antígenos estándar. Estos valores se utilizan para asignar las muestras de prueba en uno de los ocho grupos de título según la tabla que se muestra a continuación.

Utilizando las siete muestras estándar es posible asignar las muestras de prueba en ocho grupos de títulos según la siguiente tabla. Los grupos de título son muy útiles para estudios de población. Moore y Copeman (1990) asignaron unidades de antígenos a los siete controles.

Asignación de muestras a grupos de título				
Grupo de Título	Absorbancia	Estándar No.	Unidades de antígenos	Valores medios de OD
1	< Muestra de control nº 1	1	<10	0.059
2	< Muestra de control nº 2	2	32	0.335
3	< Muestra de control nº 3	3	128	0.556
4	< Muestra de control nº 4	4	512	0.992
5	< Muestra de control nº 5	5	2,048	1.520
6	< Muestra de control nº 6	6	8,192	2.243
7	< Muestra de control nº 7	7	32,000	2.809
8	> Muestra de control nº 7			>3.0

Nota: Los resultados de los estándares 1-7 deben estar dentro del rango de una curva estándar lineal. Consulte los valores medios de OD para cada estándar.

La muestra de control estándar 1 no contiene ningún antígeno (<OD 0,2). Las muestras de prueba asignadas al grupo de título 1 pueden considerarse no reactivas (negativas). Las muestras asignadas al grupo de título 2 son reactivas equívocas (zona gris) y la prueba puede repetirse. Las muestras de prueba asignadas en los grupos de título 3-7 son reactivas positivas que contienen antígeno filarial circulante (CFA).

Un estudio previo realizado en Nueva Guinea, Ghana, Filipinas e India mostró que este grupo representaba hasta el 10% de las muestras de prueba. Ninguna de las muestras australianas de una población no infectada se asignó al grupo 3. Es muy probable que las muestras asignadas al grupo 3 estén reaccionando en el ensayo. Se recopilarán más datos sobre este grupo para determinar su estado.

Método recomendado de interpretación de baja prevalencia

Se introduce una interpretación de baja prevalencia en este ensayo debido a los impactos significativos de la administración masiva de medicamentos (MDA) destinada a eliminar la filariasis. Este método se aplica a estudios de baja prevalencia donde los niveles de antígenos habían disminuido significativamente, cerca del punto final, tras la repetición de MDA donde los niveles de antígenos están por debajo del Grupo Título 3.

Utiliza el estándar 2 como referencia para determinar un valor de corte que defina una muestra baja positiva y una negativa. Si la lectura de OD estándar 2 está dentro de +/- 10% de OD 0,35, y la curva es lineal o dentro del rango de los valores medios de la Tabla 1, este valor se utilizará como valor de corte para la interpretación de resultados. Si el estándar 2 no está dentro del rango de OD 0,35, se utilizará un valor de corte por defecto de OD 0,35.

El valor de corte por defecto de 0,35 de OD se determinó utilizando 300 muestras de suero no endémico procedentes de Australia. El valor de corte se determinó calculando la desviación estándar media de la OD +3. Se espera que el estándar 2 proporcione un valor de OD 0,35 a 450/620nm de longitud de onda, aunque puede variar entre ensayos.

Estudios de muestras de suero de residentes australianos no infectados

Suero:	Muestra	de desviación estándar	media
Estudio 1	303	OD 0,149	0,019
Estudio 2	66	OD 0,063	0,129

Muestra de sangre seca en papel filtro:

Estudio 1	100	OD 0,149	0,045
-----------	-----	----------	-------

NOTAS SOBRE EL ENSAYO

Este kit ha sido diseñado para usarse junto con muestras de suero o plasma. Las muestras se hierven en una solución de EDTA y se centrifugan. Se ha demostrado que este tratamiento disocia complejos de antígeno/anticuerpos. El antígeno objetivo es termoestable y se retiene en el sobrenadante. Tras el tratamiento, puede haber hasta un aumento de cuatro veces en el título de antígenos. Sin embargo, el tratamiento de hervición puede ser opcional; un estudio de Reeve, D y Melrose W, 2014 y estudios internos (no publicados) encontraron que el tratamiento de hervición puede no aumentar significativamente la sensibilidad del ensayo; sin embargo, el uso de una dilución adecuada puede anular la diferencia si las muestras no se tratan hirviendo.

Para muestras de sangre de papel de filtro, se requiere un paso de solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1% para reducir la interferencia de la peroxidasa endógena liberada por la hemólisis de glóbulos rojos sobre el papel filtro. Las muestras de prueba pueden manejarse en un formato de microtítulo de 96 pozos utilizando tubos en rack. Las estanterías están modificadas para permitir colocarlas en un baño de maría hirviendo. Posteriormente, las cremalleras pueden centrifugarse en un rotor con cubos de microtítulo a aproximadamente 2.000 g durante 15 minutos.

Las placas de microtítulo de 96 pozos suministradas están recubiertas con un anticuerpo monoclonal (Og4C3) que ha demostrado reconocer específicamente solo el antígeno *Wuchereria bancrofti* en suero humano. Og4C3 no reaccionará cruzadamente con suero humano infectado con *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *Strongyloides stercoralis*, *Dracunculus medinensis* o *Ascaris lumbricoides*. El parásito del ganado, *Onchocerca gibsoni* se reconoce por este anticuerpo monoclonal y se utiliza para estandarizar el ELISA.

El anticuerpo indicador se produce vacunando conejos con antígeno *purificado de Onchocerca gibsoni* y el conjugado es una globulina anticonejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante. La adición de solución de sustrato TMB produce un color azul durante el desarrollo de muestras positivas, una reacción que se detiene con la adición de solución de parada, en la que el color azul se convierte en amarillo.














Se puede preparar una cámara húmeda para incubar placas colocando varias capas de tejido húmedo de laboratorio planas en el fondo de una caja de plástico con tapa. Las placas pueden colocarse sobre el tejido húmedo de laboratorio e incubarse en una incubadora o baño María de 37°C.

References

Referencias

- More, S.J., and Copeman, D.B. (1990) A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *Tropical Medicine and Parasitology* 41: 403- 406
- Partono, F., Oernijati, S. and Hudojo, I. (1977) Malayan filariasis in Central Sulawesi (Celebes), Indonesia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 8: 452-458
- Reeve, D. and Melrose, W. (2014), Evaluation of the Og4C3 Filter Paper Technique in Lymphatic Filariasis Prevalence Studies, *Lymphology* 47 (2014) 65-72.
- Turner P., Copeman B., Gerisi, D. and Speare R (1993) A comparison of the OG4C3 antigen capture ELISA, the Knott test, an IgG4 assay and clinical signs, in the diagnosis of Bancroftian filariasis. *Tropical Medicine and Parasitology* 44: 45-48
- World Health Organisation (1984) Lymphatic Filariasis. Fourth Report of the WHO Expert Committee on Filariasis, Geneva. WHO Technical Services 702

EXPLANATION OF SYMBOLS EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS

	Consult Instructions for Use <i>Consulta las instrucciones de uso</i>			Cellabs Pty Ltd Unit 7, 27 Dale Street Brookvale, NSW 2100 Australia Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426 Web: http://www.cellabs.com.au Email: sales@cellabs.com.au
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo médico diagnóstico in vitro			
	Temperature Limitation <i>Limitación de temperatura</i>			
	Batch/Lot <i>Lote</i>			WMDE Bergerweg 18 6085 AT Horn The Netherlands
	Control Positive <i>Control Positivo</i>			
	Control Negative <i>Control Negativo</i>		 	LF2.4 12 January 2026
	Use By/Expiration Date <i>Fecha de caducidad</i>			
	Do Not Re-use <i>No reutilizar</i>			