

FASCIOLA HEPATICA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Fasziole

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9650**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) humaner Fasziole.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit **Fasciola hepatica** rekombinantes Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9650-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit Fasciola hepatica rekombinantes Antigen	96	Wells
DILB	9650-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9650-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9650-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9650-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9650-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9650-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9650-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9650-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9650-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9650-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9650-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9650-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9650-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9650-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9650-10 im Puffer 9650-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9650-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9650-02, 9650-03, 9650-04 und 9650-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9650-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9650-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9650-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9650-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9650-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9650-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9650-10 + 9650-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 8 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9650-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Fasziole und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9650-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Fasciola hepatica** rekombinantes-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9650-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Fasciola hepatica** rekombinantes-Antigen als signifikant angesehen. Die Interpretation der Resultate sollte die Kreuzreaktivität anderer parasitärer Infektionen (unten genannt), die klinischen Symptome und die endemische Situation mit einbeziehen.

Sensitivität und Spezifität:

Eine Sensitivität von 77 % wurde bei einer Gruppe von 13 Seren von Patienten mit Fasziole gefunden.

Eine Spezifität von 99 % wurde bei einer Gruppe von 99 Seren von Blutspendern (Schweiz) gefunden.

Eine Spezifität von 98 % wurde bei einer Gruppe von 100 Seren von Patienten einer Infektiologie-Abteilung (Schweiz) gefunden.

Der Test mit 30 Trägern anderer parasitärer Infektionen zeigte eine Spezifität von 97 %. Filariose (0/12), zystischer Echinokokkose (0/5), Bilharziose (0/1) und alveoläre Echinokokkose (1/12).

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.459	1.491	0.469	1.547
Standardabweichung (A Wert)	0.023	0.089	0.028	0.069
Variationskoeffizient (%)	5.0	6.0	5.9	4.5

Referenzen:

Figuroa-Santiago, O., Delgado, B. and Espino, A.M. (2011) Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70, 355-361.

Gottstein B, Schneeberger M, Boubaker G, Merkle B, Huber C, et al. (2014) Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from Fasciola hepatica for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis. PLoS Negl Trop Dis 8(6): e2860. doi:10.1371/journal.pntd.0002860



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

