

FASCIOLA HEPATICA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human Fasciolosis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9650
EC reg. N°: CH-201504-0006



Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af human fasciolosis.

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyser (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Fasciola hepatica* rekombinant antigen. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9650-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Fasciola hepatica</i> rekombinant antigen	96	brønde
DILB	9650-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9650-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9650-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9650-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	9650-07	Svagt positivt serum	200	µl
CONTROL +	9650-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	9650-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	9650-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μl). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9650-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepudd.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9650-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9650-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μl kontrolsera 9650-06 til -08 i 190 μl fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μl serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9650-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 9650-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9650-10 i ufortyndet buffer 9650-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 9650-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 9650-02, 9650-03, 9650-04 og 9650-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (N_3Na). Løsning 9650-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9650-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9650-06 til -8) er fra kaniner.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9650-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9650-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9650-09 + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9650-06 til -8 + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9650-10 + 9650-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 8% af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9650-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af fasciolosis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9650-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Fasciola hepatica** rekombinant antigen klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af den svagt positive kontrol 9650-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Fasciola hepatica** rekombinant antigen for at være klinisk signifikant. Fortolkningen af dette resultat bør inddrage krydsreaktiviteter af andre parasitinfektioner (understående), de kliniske symptomer og den endemiske situation.

Analysens sensitivitet og specificitet:

En **sensitivitet** på **77%** blev fundet med 13 sera fra patienter med fasciolosis.
En **specificitet** på **99%** blev fundet med 99 sera fra bloddonorer (schweiziske).
En **specificitet** på **98%** blev fundet med 100 sera fra patienter (schweiziske) på en infektologi afdeling.
Testen af 30 patienter med andre parasitinfektioner viste en **specificitet** på **97%**. Filariasis (0/12), hydatidosis (0/5), Bilharzia (0/1) og alveolær ekinokokkose (1/12).

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (OD værdi)	0,459	1,491	0,469	1,547
Standardafvigelse (OD værdi)	0,023	0,089	0,028	0,069
Variationskoefficient (%)	5,0	6,0	5,9	4,5

Referencer:

Figueroa-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

