

FASCIOLA HEPATICA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu fasciolózy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. **9650**
Reg. č. ES: CH-201504-0006



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) fasciolózy u lidí.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících rekombinantní antigeny *Fasciola hepatica*. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9650-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rekombinantní antigeny <i>Fasciola hepatica</i>	96	destiček
DILB	9650-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9650-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9650-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9650-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9650-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9650-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9650-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9650-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	Kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	Kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

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.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9650-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. 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 s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9650-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9650-03 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.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 µl kontrolního séra 9650-06 na -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 µl séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9650-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9650-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9650-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9650-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9650-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9650-02, 9650-03, 9650-04 a 9650-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (NaN_3). Roztok 9650-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9650-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9650-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9650-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9650-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9650-09 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9650-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9650-10 + 9650-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Postup:

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 zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtete hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 8 % A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabého pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9650-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů fasciolózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9650-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rekombinantním antigenům **Fasciola hepatica** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního kontrolního vzorku 9650-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rekombinantním antigenům **Fasciola hepatica** považována za klinicky významnou. Interpretace tohoto výsledku musí vzít v úvahu vzájemné reaktivity dalších parazitických infekcí (uvedeny níže), klinické symptomy a endemickou situaci.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost 77 % byla zjištěna u 13 sér od pacientů s fasciolózou.

Specifita o hodnotě 99 % byla zjištěna u 99 sér dárců krve (Švýcarsko).

Specifita o hodnotě 98 % byla zjištěna u 100 sér od pacientů infekcologické jednotky (Švýcarsko).

Test 30 pacientů s dalšími parazitními infekcemi ukázal **specifitu o hodnotě 97%**. Filarióza (0/12), hydatidóza (0/5), bilharzie (0/1) a alveolární echinokokóza (1/12).

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 (hodnota OD)	0,459	1,491	0,469	1,547
Standardní odchylka (hodnota OD)	0,023	0,089	0,028	0,069
Koeficient odchylky (%)	5,0	6,0	5,9	4,5

Reference:

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

Batiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

