

# 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):

<b>WELL</b>	9650-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rekombinantní antigeny <i>Fasciola hepatica</i>	96	destiček
<b>DILB</b>	9650-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9650-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9650-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9650-05	Zastavovací roztok (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9650-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9650-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9650-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
<b>CONJ</b>	9650-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
<b>SUBS</b>	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  $\mu$ l). 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  $\mu$ l kontrolního séra 9650-06 na -08 ve 190  $\mu$ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

**Testované sérum:** zředte 10  $\mu$ l 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:** předehřejte 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 ( $\text{N}_3\text{Na}$ ). Roztok 9650-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9650-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) 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 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9650-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9650-09 + tlumicí roztok na ředění	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9650-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	$\mu$ l + $\mu$ l	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  $\mu$ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

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

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l roztoku substrátu do každé destičky.

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

Zastavte reakci přidáním 100  $\mu$ 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 infektologické 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
<b>Průměr (hodnota OD)</b>	0,459	1,491	0,469	1,547
<b>Standardní odchylka (hodnota OD)</b>	0,023	0,089	0,028	0,069
<b>Koeficient odchylky (%)</b>	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

