

# FASCIOLA HEPATICA

## Enzymatický imunologický test pro diagnózu fasciolózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití

Návod k použití pro produkt č. **9650**  
EC reg. č.: CH-201504-0006



### Předpokládané použití:

Sada ELISA *Fasciola hepatica* od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti larvám *Fasciola hepatica* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

### Pozadí:

Fasciolóza bývá obvykle způsobena ploštěncem *Fasciola hepatica* (jaterní motolicí). Lidé se mohou nakazit po požití syrové potočnice nebo jiné vodní rostliny kontaminované infekčním parazitem ve stádiu larev. Nedospělé larvy motolice nejprve pronikají jaterním parenchymem, přičemž způsobují traumatické jaterní selhání, a později se dostávají do žlučových, kde se vyvíjejí do podoby dospělých motolic produkujících vajíčka. V rané fázi mohou symptomy zahrnovat žaludečně-střevní problémy jako nevolnost, zvracení a bolest/citlivost na tlak v břiše. Během chronické fáze mohou být klinické projevy podobné nebo individuálnější, mohou reagovat na zánět a blokádu žlučových, což se může střídát. Diagnóza je založena na detekci vajíček ve stolici a na pozitivním výsledku sérologického testu.

### Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících rekombinovaný antigen *Fasciola hepatica*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Fasciola hepatica* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

### Materiály obsažené v sadě (96 testů):

<b>WELL</b>	9650-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rekombinovaný antigen <i>Fasciola hepatica</i>	96	destiček
<b>DILB</b>	9650-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	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 (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9650-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9650-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9650-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
<b>CONJ</b>	9650-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
<b>SUBS</b>	9650-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

### **Datum spotřeby a skladování:**

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejich součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

### **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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

### **Příprava činidel před použitím:**

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

**Destičky ELISA:** Otevřete bok hliníkové tašky 9650-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

**Tlumicí roztok na ředění:** Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9650-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Vyplachovací roztok:** Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Kontrolní sérum:** Zředte 10 µl kontrolního séra 9650-06 na -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Konjugát:** Zředte konjugát 9650-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

**Roztok substrátu:** rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9650-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9650-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

**Zastavovací roztok:** Použijte neředěné činidlo 9650-05.

### **Odebírání a příprava vzorků:**

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

### **Varování a bezpečnostní opatření:**

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9650-02	0,1 %	0,02 %
Vyplachovací roztok (10 x)	9650-03	0,05 %	/
Tlumicí enzym	9650-04	0,01 %	/
Kontrolní sérum (20 x)	9650-06 až -08	0,1 %	0,02 %
Konjugát (50 x)	9650-09	0,1 %	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 9650-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9650-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

### **Pokyny k likvidaci odpadu:**

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

### **Postup:**

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

#### **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 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdná).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

#### **Krok 3: Inkubace s konjugátem:**

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky bez séra, prázdné).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

#### **Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:**

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

#### **Krok 5: Měření absorbancí:**

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

### **Interpretace:**

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A negativního kontrolního vzorku < 9 % A pozitivního kontrolního vzorku
- A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

51089\_02 9650 Tch 01.2018

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9650-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů fasciolózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rekombinovanému antigenu *Fasciola hepatica* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rekombinovanému antigenu *Fasciola hepatica* považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

### Citlivost a specificita:

Citlivost 77% byla zjištěna u 13 sér pacientů trpících fasciolózou. Specificita o hodnotě 99% byla zjištěna u 99 sér dárců krve (Švýcarsko). Specificita o hodnotě 98% byla zjištěna u 100 sér od pacientů infekční jednotky (Švýcarsko).

### Interference:

Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

### Upřesnění:

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 (absorbance)</b>	0.459	1.491	0.469	1.547
<b>Standardní odchylka (absorbance)</b>	0.023	0.089	0.028	0.069
<b>Koeficient odchylky (%)</b>	5.0	6.0	5.9	4.5

### Omezení:

Specificita 97% byla zjištěna u 30 sér pacientů s jinou parazitickou infekcí. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s alveolární echinokokózou.

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

### 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**  
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

