

Fasciola hepatica IgG ELISA

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση φασιολίωσης σε άνθρωπο

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια για in vitro διαγνωστική χρήση και για επαγγελματική εργαστηριακή χρήση



Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. 9650
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: CH-201504-0006 - UDI-DI: 07640158219652



Προβλεπόμενη χρήση:

Το κιτ *Fasciola hepatica* IgG ELISA της Bordier προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κατηγορίας αντισωμάτων IgG έναντι της *Fasciola hepatica* σε ανθρώπινο ορό. Η ορολογική εξέταση αποτελεί βοήθημα για τη διάγνωση και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδική μέθοδος διάγνωσης.

Υπόβαθρο:

Η φασιολίωση προκαλείται κυρίως από το τριημάτωδες *Fasciola hepatica* (Δίστομο το ηπατικό). Οι άνθρωποι μπορούν να μολυνθούν με την κατανάλωση ωμού νεροκάρδαμου ή άλλων φυτών νερού μολυσμένων με μολυσματικά προνυμφικά παράσιτα σε διάφορα στάδια. Οι ανώριμες προνύμφες μεταναστεύουν πρώτα μέσω του παρεγχύματος του ήπατος, προκαλώντας τραυματική δυσλειτουργία του ήπατος και αργότερα στους χολικούς αγωγούς, όπου αναπτύσσονται σε ώριμα ενήλικα σκουλήκια, τα οποία παράγουν αυγά. Στην πρώιμη φάση, τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν γαστρεντερικά προβλήματα όπως ναυτία, έμετο και κοιλιακό άλγος/ευαισθησία. Κατά τη χρόνια φάση της νόσου, οι κλινικές εκδηλώσεις μπορεί να είναι παρόμοιες ή πιο διακριτές, εκδηλώνοντας φλεγμονή και απόφραξη των χολικών αγωγών, οι οποίες μπορεί να είναι διαλείπουσες. Η διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση αυγών στα κόπρανα και σε ένα θετικό αποτέλεσμα μέσω ορολογικών εξετάσεων.

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει όλο το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε εύθραυστα φρεάτια μικροπιλοδότησης ευαισθητοποιημένα με ανασυνδυασμένα αντιγόνα *Fasciola hepatica*. Συγκεκριμένα αντισώματα στο δείγμα θα δεσμευτούν σε αυτά τα αντιγόνα και η πλύση θα απομακρύνει μη συγκεκριμένα αντισώματα. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Ένα δεύτερο στάδιο πλύσης θα απομακρύνει το αδέσμευτο σύζευγμα. Η αποκάλυψη δεσμευμένων αντισωμάτων γίνεται με την προσθήκη υποστρώματος pNPP το οποίο γίνεται κίτρινο παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης. Η ένταση χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των ειδικών αντισωμάτων *Fasciola hepatica* στο δείγμα. Προστίθεται φωσφορικό κάλιο για να σταματήσει η αντίδραση. Η απορρόφηση στα 405 nm διαβάζεται χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπιακών ELISA.

Η δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί με αυτόματα συστήματα, αλλά κάτι τέτοιο πρέπει να επικυρωθεί από το χρήστη.

Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές):

WELL	9650-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με ανασυνδυασμένα αντιγόνα <i>Fasciola hepatica</i>	96	φρεάτια
DILB	9650-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα, χρωματισμένο μωβ	50	ml
WASH	9650-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
ENZB	9650-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
STOP	9650-05	Ανασχετικό διάλυμα (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα, (20 x), πράσινο καπάκι	200	μl
CONTROL -/+	9650-07	Ασθενής θετικός ορός μάρτυρα (διακοπή, 20 x), κίτρινο καπάκι	200	μl
CONTROL +	9650-08	Θετικός ορός μάρτυρα (20 x), κόκκινο καπάκι	200	μl
CONJ	9650-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α-αλκαλικής φωσφατάσης (50 x), μωβ καπάκι	300	μl
SUBS	9650-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης (παρα-νιτροφαινολοφωσφορικό) Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml	20	δισκία
		Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	1	τεμάχιο
			1	τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8°C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος), αποφύγετε τη μακροχρόνια έκθεση των συστατικών στο άμεσο φως. Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού. Μετά το αρχικό άνοιγμα, όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται στους 2° έως 8°C.

Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και μl). Φιάλες. Σωλήνες για την αραιώση του ορού. Κολητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37°C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm. Χειροκίνητος ή αυτόματος εξοπλισμός για φρεάτια πλύσης. Αναμικτήρας με δίνη. Χρονοδιακόπτης.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φέρτε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου και αναμείξτε πριν τη χρήση.

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9650-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται (ένα για κενό, τρία για μάρτυρες συν τον αριθμό των δειγμάτων). Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9650-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Αυτό χρησιμοποιείται για την αραιώση των μαρτύρων, των δειγμάτων και του συζεύγματος. Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα είναι σταθερό για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

Διάλυμα πλύσης: αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9650-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης. Το αραιωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 μl ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201). Οι αραιωμένοι οροί μάρτυρες είναι σταθεροί για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

Σύζευγμα: αραιώστε σύζευγμα 9650-09 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/50). Αραιώστε το σύζευγμα την ημέρα της δοκιμής. Μην αποθηκεύετε αραιωμένο σύζευγμα.

Διάλυμα υποστρώματος: διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9650-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9650-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων). Αραιώστε το υπόστρωμα την ημέρα της δοκιμής και προστατέψτε τον σωλήνα από το άμεσο φως. Τα δισκία και τα διαλύματα υποστρώματος πρέπει να είναι άχρωμα ή να έχουν μόνο ελαφρά κίτρινη απόχρωση. Εάν ένα δισκίο ή ένα διάλυμα υποστρώματος γίνεται κίτρινο, μπορεί να έχει εν μέρει υδρολυθεί και θα πρέπει να απορρίπτεται. Μην αποθηκεύετε το διάλυμα υποστρώματος.

Ανασχετικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9650-05 μη αραιωμένο.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων:

Χρησιμοποιήστε ανθρώπινο ορό. Ο ορός θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C εάν αναλυθεί μέσα σε λίγες ημέρες, διαφορετικά θα πρέπει να φυλάσσεται στους -20°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη. Ανακατέψτε με δίνη τα δείγματα και αραιώστε 1/201 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (για παράδειγμα 5 μl δείγματος σε 1,0 ml).

Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα:

Οι τοξικές ενώσεις βρίσκονται στην ακόλουθη συγκέντρωση:

Συστατικό	Αναφορά	Αζίδιο του νατρίου (Na ₂ N ₃)	Merthiolate
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)	9650-02	0,1%	0,02%
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9650-03	0,05%	/
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	9650-04	0,01%	/
Οροί μάρτυρα (20 x)	9650-06 έως -08	0,1%	0,02%
Σύζευγμα (50 x)	9650-09	0,1%	/

Στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, το αζίδιο του νατρίου και το merthiolate δεν παρουσιάζουν τοξικολογικό κίνδυνο σε επαφή με το δέρμα και τις βλεννώδεις μεμβράνες.

- Το ανασχετικό διάλυμα 9650-05 (0,5 M K₃PO₄) είναι ερεθιστικό.
- Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9650-06 έως -08) είναι από κουνέλια.
- Αντιμετωπίστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα ως δυνητικά μολυσματικό υλικό.
- Μην ανταλλάσσετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων ή κιτ ELISA της Bordier.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών με αντιδραστήρια αυτού του κιτ.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Κλείστε καλά τα φιαλίδια των αντιδραστηρίων αμέσως μετά τη χρήση και μην αλλάζετε τα βιδωτά καπάκια για να αποφύγετε τη μόλυνση.
- Χρησιμοποιήστε ξεχωριστές και καθαρές άκρες πιπέτας για κάθε δείγμα.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε μικροφρεάτια.

- ποφύγετε τη φθορά των μικροβυθισμάτων με μηχανική δράση (άκρες/κώνοι, ακροφύσια).
- Οι περιγραφές των συμβόλων που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες βρίσκονται στον ιστότοπο www.bordier.ch.

Σχετικά με την απόρριψη:

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή αυτή θεωρούνται γενικά επικίνδυνα απόβλητα. Ανατρέξτε στις εθνικές και περιφερειακές νομοθετικές και κανονιστικές διατάξεις για την απόρριψη επικίνδυνων αποβλήτων.

Διαδικασία:

Κατά την εκτέλεση της δοκιμής, αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στα φρεάτια.

Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης.

Επνώστε για **5 με 15 λεπτά** σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικού, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα. Για δοκιμές άνω των 25 δειγμάτων, συνιστούμε να γεμίσετε τα τελευταία τρία φρεάτια με ορούς μάρτυρα ως αντίγραφο.

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τα αραιωμένα δείγματα (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επνώστε για **30 λεπτά** στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης ~ 250 μl.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα σε κάθε φρεάτιο (συμπεριλαμβανομένου χωρίς κενό ορού).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επνώστε για **30 λεπτά** στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης ~ 250 μl.

Βήμα 4: Επώαση με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επνώστε για **30 λεπτά** στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Εάν χρειαστεί, καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων και εξαλείψτε τις φυσαλίδες. Μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm εντός 1 ώρας μετά την προσθήκη του ανασχετικού διαλύματος.

Ερμηνεία:

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Όταν είναι εφικτό, υπολογίστε τις μέσες τιμές απορρόφησης του ορού διπλού μάρτυρα. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

- Απορρόφηση (A) θετικού ορού μάρτυρα > 1,200
- A ασθενούς θετικού ορού μάρτυρα > 8% της A θετικού ορού μάρτυρα
- A αρνητικού ορού μάρτυρα < 8% της A θετικού ορού μάρτυρα
- A χωρίς κενό ορού < 0,350

Οι έλεγχοι ποιότητας των τρεχουσών παρτίδων δημοσιεύονται στην ιστοσελίδα μας: www.bordier.ch.

Η συγκέντρωση αντισωμάτων του ασθενούς θετικού (διακοπή) ορού 9650-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλπιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις φασιολίασης και υγιείς ανθρώπινους ορούς. Η απορρόφηση διακοπής ενός δείγματος ορίζεται, μετά την αφαίρεση του χωρίς κενό ορού, ως εξής:

$$\text{Δείκτης} = \frac{\text{Δείγμα απορρόφησης}}{\text{Ορός διακοπής απορρόφησης}}$$

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερος από **1,0**. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνων *Fasciola hepatica* είναι κλινικώς μη σημαντική.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερος από **1,0**. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνων *Fasciola hepatica* είναι κλινικώς σημαντική. Υποδεικνύει ότι ο ασθενής είχε έρθει σε επαφή με το παράσιτο.

Μία γκρίζα ζώνη θα μπορούσε να οριστεί από κάθε εργαστήριο ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών του. Σε περίπτωση οριακών ή αμφίβολων αποτελεσμάτων, σας συνιστούμε να επαναλάβετε τη δοκιμή 2-4 εβδομάδες αργότερα, με ένα νέο δείγμα.

Σε περίπτωση θετικού ή αμφίβολου αποτελέσματος, σας συνιστούμε να διενεργήσετε μια δοκιμή επιβεβαίωσης (συνήθως μέσω ανοσοαποτύπωσης [western blot]), εφόσον μια τέτοια δοκιμή είναι διαθέσιμη ή απαιτείται από τους εθνικούς κανονισμούς.

Αναλυτικές παραστάσεις:

Αναλυτική ιδιαιτερότητα:

Εντοπίστηκε εξειδίκευση 97% με 30 ορούς ασθενών με άλλες παρασιτικές λοιμώξεις. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με κυψελιδική εχινοκοκκίαση.

Δεν παρατηρήθηκε καμία θετική ή αρνητική παρεμβολή με συγκεντρώσεις αιμοσφαιρίνης, λιπιδίων ή χολερυθρίνης που υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια σε ορούς συμπληρωμένους με παρεμβαλλόμενους παράγοντες.

Ακρίβεια:

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή. Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (απορρόφηση)	0,459	1,491	0,469	1,547
Τυπική απόκλιση (απορρόφηση)	0,023	0,089	0,028	0,069
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	5,0	6,0	5,9	4,5

Οι ακόλουθες επιδόσεις δεν μπορούν να αξιολογηθούν, καθώς δεν υπάρχει πιστοποιημένο υλικό αναφοράς για αυτή την ανάλυση:

- Αναλυτική ευαισθησία (όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού)
- Ακρίβεια
- Αλήθεια
- Εύρος μέτρησης
- Γραμμικότητα

Κλινικές επιδόσεις:

Διαγνωστική ευαισθησία:

Εντοπίστηκε ευαισθησία 77% με 13 ορούς από ασθενείς που έπασχαν από φασιολίαση.

Διαγνωστική ειδικότητα:

Εντοπίστηκε εξειδίκευση 99% με 99 ορούς αιμοδοτών (Ελβετοί). Εντοπίστηκε εξειδίκευση 98% με 100 ορούς ασθενών από μια μονάδα λοιμώξεων (ελβετική).

Θετική και αρνητική τιμή πρόβλεψης:

Βρέθηκαν PPV 77% και NPV 98% με τους προαναφερθέντες πληθυσμούς.

Αναμενόμενες τιμές σε φυσιολογικούς και προσβεβλημένους πληθυσμούς:

Σε έναν φυσιολογικό πληθυσμό 99 Ελβετών αιμοδοτών και 100 ορών από μια ελβετική μονάδα λοιμώξεων, η αναμενόμενη τιμή του δείκτη είναι 0,46. Σε έναν προσβεβλημένο πληθυσμό 13 ορών από ασθενείς που έπασχαν από φασιολίαση, η αναμενόμενη τιμή του δείκτη είναι 5,01.

Περιστατικά:

Κάθε σοβαρό περιστατικό που συμβαίνει σε σχέση με τη συσκευή πρέπει να κοινοποιείται στον κατασκευαστή και στην αρμόδια αρχή του κράτους μέλους στο οποίο είναι εγκατεστημένος ο χρήστης ή/και ο ασθενής.

Περιορισμοί:

Η διάγνωση μιας μολυσματικής νόσου δεν θα πρέπει να καθοριστεί βάσει ενός ενιαίου αποτελέσματος των δοκιμών. Η ακριβής διάγνωση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ενδημική κατάσταση, το κλινικό ιστορικό, τη συμπτωματολογία, την απεικόνιση καθώς και τα ορολογικά δεδομένα.

Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και στα νεογνά τα ορολογικά δεδομένα έχουν περιορισμένη αξία.

Αναφορές:

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

