

Fasciola hepatica IgG ELISA

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej fasciolózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre artikel č. **9650**
UDI-DI: 07640158219652



Plánované použitie:

Súprava Bordier *Fasciola hepatica* IgG ELISA je určená na kvalitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Fasciola hepatica* v ľudskom sére. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

Pozadie:

Fasciolóza je spôsobená hlavne cudzopasnou hlístou *Fasciola hepatica* (motolica). Ľudia môžu byť infikovaní jedením surovej žeruchy alebo iných vodných rastlín kontaminovaných infekčnými parazitnými larválnymi fázami. Nezrelé larvové motolice prvýkrát migrujú cez pečenný parenchým, čo spôsobuje traumatickú dysfunkciu pečene a neskôr cez žľazové kanály, kde sa vyvíjajú do dospelých motolíc, ktoré produkujú vajíčka. V počiatočnej fáze symptómy môžu zahŕňať gastrointestinálne problémy, ako je nevoľnosť, vracanie a bolesť/citlivosť brucha. Počas chronickej fázy môžu byť klinické prejavy podobné alebo diskretnejšie, odrážajúc zápal a upchatie žľazovodov, ktoré môžu byť prerušované. Diagnóza je založená na detekcii vajíčiek v stolici a pozitívnym výsledkom sérologického testovania.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitizedých rekombinantným antigénom ***Fasciola hepatica***. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalické fosfatázy. Druhý premývací krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalické fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Fasciola hepatica* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodostičiek ELISA.

Test je manuálny, ale je možné vykonať s automatickými systémami, ktoré musí byť overený používateľom.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9650-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedé antigénmi rekombinantným <i>Fasciola hepatica</i>	96	jamky
DILB	9650-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
WASH	9650-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9650-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9650-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
CONTROL -/+	9650-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
CONTROL +	9650-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
CONJ	9650-09	Proteín A - konjugát alkalické fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
SUBS	9650-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Uložte súpravu medzi +2°C až +8°C (transport validovaný medzi -20°C a +37°C počas 21 dní), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri teplote +2°C až +8°C.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu +37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reaktanty medzi +20°C až +30°C po dobu najmenej 1 hodiny a pred použitím premiešajte.

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9650-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9650-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote +2°C až +8°C.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9650-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalické fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote +2°C až +8°C.

Kontrolné séra: rozriedte 10 µl kontrolných sér 9650-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote +2°C až +8°C.

Konjugát: rozriedte konjugát 9650-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

Roztok substrátu: rozpustíte tablety substrátu fosfatázy 9650-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9650-04 (1 tableta v 2,5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu neskladujte.

Zastavovací roztok: použite reagent 9650-05, nezriedený.

Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Uložte medzi +2°C až +8°C, ak je analyzovaná do 7 dní, inak sa skladujte pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu. Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml). Zriedenú vzorku neskladujte.

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN ₃)	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9650-02	0,1%	0,02%
Premývací roztok (10 x)	9650-03	0,05%	/
Premývací roztok	9650-04	0,01%	/
Kontrolné séra (20 x)	9650-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9650-09	0,1%	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

Zložka	Nebezpečná zložka	Nebezpečná zložka	Vyhlásenie o nebezpečenstve	Preventívne vyhlásenie
Zastavovací roztok	fosforečnan draselný trojzložkový		Spôsobuje vážne poškodenie očí	Noste ochranné okuliare. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9650-06 až -08) sú živočíšneho pôvodu (králiky) a musí sa s nimi zaobchádzať opatrne.
- Zaobchádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentami a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.
- Zabráňte znehodnoteniu mikrojamek mechanickým pôsobením (špičky/kužele, dýzy).
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke www.bordier.ch.

Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

Krok 1: Predinkubácia:

Naplňte jamky 250 µl tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote +20°C až +30°C.

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorky bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri +37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri +37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri +37°C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabej pozitívnej kontrolnej vzorky > 8% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 8% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra < 0.350

V prípade, že signál vzorky prekročí merací rozsah čítačky mikrotitračných doštičiek, mala by sa priradiť hodnota zodpovedajúca hornému meraciemu rozsahu čítačky.

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: www.bordier.ch.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9650-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov fasciolózy a zdravým ľudským sérom. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Fasciola hepatica** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky väčší alebo rovný ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Fasciola hepatica** považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať potvrdzovací test (najčastejšie western blot), ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštátnymi predpismi.

Analytické výkony:

Analytická špecifickosť:

Presnosť s výškou 97 % sa zistila v 30 sérach pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa vyskytuje hlavne u pacientov s alveolárnou echinokokózou.

Pri suprafyziologických koncentráciách hemoglobínu, lipidov alebo bilirubínu v sérach doplnených interferentmi sa nepozorovala žiadna pozitívna ani negatívna interferencia.

Precíznosť:

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v duplikáte 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0,459	1,491	0,469	1,547
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0,023	0,089	0,029	0,095
Variačný koeficient (%)	5,0	6,0	6,2	6,1

Klinické výkony:

Diagnostická citlivosť:

Citlivosť 77 % sa zistila v 13 sérach pacientov trpiacich fasciolíázou.

Diagnostická špecifickosť:

Presnosť s výškou 99 % sa zistila v 99 sérach darcov krvi (švajčiarskych). Presnosť s výškou 98 % sa zistila v 100 sérach pacientov infekčného oddelenia (Švajčiarsko).

Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota:

Pri vyššie uvedených populáciách sa zistila PPV 77% a NPV 98%.

Očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie:

V normálnej populácii 99 švajčiarskych darcov krvi a 100 sér zo švajčiarskeho infekčného oddelenia je očakávaná hodnota indexu 0,46. V postihnutej populácii 13 sér pacientov trpiacich fasciolíázou je očakávaná hodnota indexu 5,01.

Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

Obmedzenia:

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

Odkazy na použitú literatúru:

Figuerola-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 S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

