

Fasciola hepatica IgG ELISA

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
UDI-DI: 07640158219652



Předpokládané použití:

Sada *Fasciola hepatica* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena ke kvalitativní detekci protilátek IgG proti *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 střídat. 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 imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících rekombinovaný antigeny *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 je manuální, ale lze jej provést i automatickými systémy, které musí být validovány uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

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

Datum spotřeby a skladování:

Soupravu skladujte při teplotě mezi +2°C až +8°C (přeprava validovaná mezi -20°C a +37°C po dobu 21 dnů), chraňte před dlouhodobým vystavením jejích součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě mezi +2°C až +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:

Všechny činidla nechte alespoň 1 hodinu zahřát v rozmezí +20°C až +30°C a před použitím promíchejte.

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 mezi +2°C až +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 mezi +2°C až +8°C.

Kontrolní séra: Zředte 10 µl kontrolního séra 9650-06 až -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/20). Naředěné kontrolní séra je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách mezi +2°C až +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(-y) 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. Pokud je test proveden do 7 dnů, skladujte sérum při teplotě mezi +2°C až +8°C, 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). Naředěné vzorky neuchovávejte.

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Složka	Odkaz	Nitrid sodný (Na_3N_3)	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 séra (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.

Složka	Nebezpečná složka	Nebezpečí piktogram	Prohlášení o nebezpečnosti	Preventivní prohlášení
Zastavovací roztok	Tribasový fosforečnan draselný		Způsobuje vážné poškození očí	Používejte ochranné brýle. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.

- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní séra (9650-06 až -08) jsou zvířecího původu (králíci) a musí se s nimi zacházet opatrně.
- 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.

- Zabraňte poškození mikrojamek mechanickým působením (špičky/kužele, trysky).
- Popisy symbolů použitých na etiketách naleznete na webových stránkách www.bordier.ch.

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: Předinkubace:

Naplňte jamky 250 µl ředícího pufru.

Inkubujte 5 až 15 minut při teplotě +20°C až +30°C.

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (vzorku bez séra).

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 vzorku bez séra).

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 teplotě +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 vzorku 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 slabě pozitivního kontrolního vzorku > 8 % A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 8 % A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

V případě, že signál vzorku překračuje měřicí rozsah čtečky mikrodestiček, měla by být přiřazena hodnota odpovídající hornímu měřicímu rozsahu čtečky.

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

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 antigenu **Fasciola hepatica** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší nebo rovná se **1,0**. V tomto případě, je koncentrace protilátek IgG proti 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.

V případě pozitivního nebo nejasného výsledku, doporučujeme provést potvrzovací test (nejčastěji metodou Western blot), pokud je takový test k dispozici nebo ho vyžadují vnitrostátní předpisy.

Analytické výkony:

Analytická specifičnost:

Specifita 97% byla zjištěna u 30 sér pacientů s jinými parazitárními infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s alveolární echinokokózou.

U suprafyziologických koncentrací hemoglobinu, lipidů nebo bilirubinu v séru doplněných interferenty nebyla pozorována žádná pozitivní ani negativní interference.

Přesnost:

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 duplicitní vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,459	1,491	0,469	1,547
Standardní odchylka (absorbance)	0,023	0,089	0,029	0,095
Koeficient odchylky (%)	5,0	6,0	6,2	6,1

Klinické výkony:

Diagnostická citlivost:

Citlivost 77% byla zjištěna u 13 sér pacientů trpících fasciolózou.

Diagnostická specifičnost:

Specifita 99% byla zjištěna u 99 sér dárců krve (Švýcarsko). Specifita 98% byla zjištěna u 100 sér pacientů infekčního oddělení (Švýcarsko).

Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedených populací byly zjištěny hodnoty PPV 77% a NPV 98%.

Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 99 švýcarských dárců krve a ve 100 sérech ze švýcarského infekčního oddělení činí očekávaná hodnota indexu 0,46. V zasažené populaci 13 sér pacientů trpících fasciolózou činí očekávaná hodnota indexu 5,01.

Incidenty:

Každý závažný incident, k němuž v souvislosti s tímto prostředkem dojde, je nutné oznámit výrobci a příslušnému orgánu členského státu, v němž je uživatel anebo pacient usazen.

Omezení:

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:

Figuerroa-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

