

Fasciola hepatica IgG ELISA

Enzymimmunoanalyse for diagnose av human fascioliasis

96 analyser på individuelle brønner for in vitro-diagnostisk bruk og for profesjonelt laboratoriebruk.



Bruksanvisning for artikkel N° 9650
UDI-DI: 07640158219652



Tiltenkt bruk:

Bordier *Fasciola hepatica* IgG ELISA-settet er ment for kvalitativ påvisning av IgG-antistoffer mot *Fasciola hepatica* i menneskelig serum. Serologi er et hjelpemiddel for diagnose og kan ikke brukes som den eneste metoden for diagnose.

Bakgrunn:

Fascioliasis er hovedsakelig forårsaket av trematoden *Fasciola hepatica* (leverikte). Mennesker kan bli smittet ved å spise rå vannkarse eller andre vannplanter forurensset med smittsomme parasittlarvestadier. De umodne larvale iktene vandrer først gjennom leverparenkymet, forårsaker traumatiske leverdysfunksjoner, og senere til gallegangene, hvor de utvikler seg til modne voksne ikt, som produserer egg. I den tidlige fasen kan symptomene inkludere gastrointestinale problemer som kvalme, oppkast og magesmerter/ømhet. Under den kroniske fasen kan de kliniske manifestasjonene være lignende eller mer diskrete, og reflektere betennelse og blokkering av gallegangene, som kan være intermitterende. Diagnosen er basert på eggdeteksjon i avføring og et positivt resultat ved serologisk testing.

Prinsipp og presentasjon:

Settet inkluderer alt materiale som behøves for å utføre 96 enzymkoblede immunoabsorberende analyser (ELISA) på nedbrytbare mikrotitreringsbrønner sensitisert med *Fasciola hepatica* rekombinant antigen. Spesifikke antistoffer i prøven vil binde seg til disse antigenene, og vasking vil fjerne uspesifikke antistoffer. Tilstedeværelsen av parasittspesifikke antistoffer oppdages med et Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Et andre vasketrinn vil fjerne ubundne konjugater. Avdekking av bundne antistoffer gjøres ved tilsetning av pNPP-substrat, som blir gult i nærvær av alkalisk fosfatase. Fargeintensitet er proporsjonal med mengden *Fasciola hepatica* spesifikke antistoffer i prøven. Kaliumfosfat tilsettes for å stoppe reaksjonen. Absorbansen ved 405 nm leses ved bruk av en ELISA mikroplateleser. Testen er manuell, men kan utføres med automatiske systemer, som må valideres av brukeren.

Materiale som er inkludert i settet (96 analyser):

WELL	9650-01	Nedbrytbare ELISA-strips sensitisert med <i>Fasciola hepatica</i> rekombinant antigen	96	brønner
DILB	9650-02	Fortynningsbuffer (10 x) konsentrat, farget lilla	50	ml
WASH	9650-03	Vaskeløsning (10 x) konsentrat	50	ml
ENZB	9650-04	Enzymløsning	50	ml
STOP	9650-05	Stoppende løsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9650-06	Negativt kontrollserum (20 x), grønn hette	200	µl
CONTROL -/+	9650-07	Svak positivt kontrollserum (grense, 20 x), gul hette	200	µl
CONTROL +	9650-08	Positivt kontrollserum (20 x), rød hette	200	µl
CONJ	9650-09	Protein A – alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hette	300	µl
SUBS	9650-10	Fosfatase-substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter
		Multipipette-beholder, 25 ml	1	stykk
		Ramme for ELISA 8-brønn-holder	1	stykk

Holdbarhet og lagring:

Oppbevar settet mellom +2°C og +8°C (transport validert mellom -20°C og +37°C i 21 dager), unngå langvarig eksponering av komponentene for direkte lys. Utløpsdatoen og partinummeret for settet er trykt på siden av boksen. Etter første åpning er alle reagenser stabile til utløpsdatoen når de oppbevares mellom +2°C og +8°C.

Utstyr som behøves, men som ikke følger med settet:

Pipetter (ml og µl). Kolber. Fortynningsrør. Tape for å dekke brønnene under inkubasjoner. Destillert vann. Inkubator satt til +37°C. ELISA-leser satt til 405 nm. Manuelt eller automatisk utstyr for å skylle brønnene. Virvelmikser. Tidtager.

Forberedelse av reagenser før bruk:

La alle reagenser ligge mellom +20°C og +30°C i minst 1 time og bland før bruk.

ELISA-brønner: åpne siden av aluminiumsposen 9650-01 og fjern antall brønner som behøves (én for blank, tre for kontroller samt antall prøver). Plasser sensiterte brønner i 8-brønn-holder(e). Om nødvendig, fyll de tomme posisjonene i holderen med brukte brønner. Sett holder(e) inn i rammen plassert korrekt. Forsegl den åpne pakken med tørkemiddelpute.

Fortynningsbuffer: fortynn fortynningsbuffer (10 x) konsentrat 9650-02, 1/10 i destillert vann. Dette brukes til fortynning av kontroller, prøver og konjugat. Den fortynnete bufferen er stabil i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Vaskeløsning: fortynn vaskeløsning (10 x) konsentrat 9650-03, 1/10 i destillert vann. Du kan også bruke din egen vaskeløsning. Unngå buffere som inneholder fosfat, da dette kan hemme den enzymatiske aktiviteten til alkalisk fosfatase. Den fortynnete vaskeløsningen er stabil i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Kontrollserum: fortynn 10 µl kontrollserum 9650-06 til -08 i 190 µl fortynningsbufferløsning (sluttfortynning 1/20). Det fortynnete kontrollserumet er stabilt i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Konjugat: fortynn konjugat 9650-09 i fortynningsbufferløsning (sluttfortynning 1/50). Fortynn konjugat på dagen for analysen. Ikke lagre fortynnet konjugat.

Substratløsning: løs opp tablett(er) av fosfatase-substrat 9650-10 i ufortynnet enzymbuffer 9650-04 (1 tablett i 2,5 ml buffer). Virvle til tablett(en) er fullstendig oppløst(e). Fortynn substratet på dagen for analysen og holdt røret unna direkte lys. Tabletter og substratløsninger skal være fargeløse eller kun ha en svak gul nyanse. Hvis en tablett eller en substratløsning blir gul, kan den ha vært delvis hydrolysert og bør kastes. Ikke oppbevar substratløsningen.

Stoppende løsning: bruk reagens 9650-05 ufortynnet.

Prøvetaking og forberedelse:

Bruk humant serum. Oppbevar mellom +2°C og +8°C hvis analysert innen 7 dager, ellers oppbevar ved -20°C eller lavere. Unngå gjentatt frysing og tining. Virvle prøvene og fortynn 1/201 i fortynningsbufferløsning (for eksempel 5 µl prøve i 1,0 ml). Ikke oppbevar fortynnet prøve.

Advarsler og forhåndsregler:

Toksiske forbindelser finnes i følgende konsentrasjon:

Komponent	Referanse	Natriumazid (NaN ₃)	Merthiolate
Fortynningsbuffer (10 x)	9650-02	0,1 %	0,02 %
Vaskeløsning (10 x)	9650-03	0,05 %	/
Enzymbuffer	9650-04	0,01 %	/
Kontrollserum (20 x)	9650-06 til -08	0,1 %	0,02 %
Konjugat (50 x)	9650-09	0,1 %	/

Ved de brukte konsentrasjonene har natriumazid og merthiolate ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinner.

Komponent	Farlig komponent	Farepiktogram	Fareerklæring	Forholdsreglererklæring
Stoppende løsning	Kaliumfosfat, tribasisk		Forårsaker alvorlig øyeskade	Bruk øyevern. VED ØYEKONTAKT: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Ta ut kontaktlinser, om tilstede og enkelt å gjøre. Fortsett å skylle.

- Det negative, grense- og positive kontrollserumet (9650-06 til -08) er av animalsk opprinnelse (kaniner) og må håndteres med forsiktighet.
- Behandle alle reagenser og prøver som potensielt smittsomme materialer.
- Ikke bytt reagenser mellom forskjellige partier eller Bordier ELISA-sett.
- Ikke bruk reagenser fra andre produsenter med reagenser fra dette settet.
- Ikke bruk reagenser etter utløpsdatoen deres.
- Lukk reagensflaskene tett umiddelbart etter bruk, og bytt ikke skrukorkene for å unngå kontaminering.
- Bruk separate og rene pipettespisser for hver prøve.
- Ikke gjenbruk mikrobrønner.
- Unngå forringelse av mikrobrønnene ved mekanisk håndtering (spisser/kjegler, dyser).
- Beskrivelsene av symbolene som brukes på etikettene finnes på nettstedet www.bordier.ch

Avfallshåndtering:

Alt materiale som brukes til denne testen betraktes generelt som farlig avfall. Henvis til nasjonale og regionale lover og forskrifter for avhending av farlig avfall.

Prosedyre:

Når du kjører analysen, unngå dannelsen av bobler i brønnene.

Trinn 1: Preinkubasjon:

Fyll brønnene med 250 µl fortynningsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter mellom +20°C og +30°C.

Fjern fortynningsbufferen ved aspirasjon eller ved å riste brønnene over vasken.

Trinn 2: Inkubasjon med prøver:

Fyll den første brønnen i den første stripen med 100 µl fortynningsbuffer (ikke-serum blank).

Fyll de påfølgende tre brønnene med henholdsvis 100 µl fortynnet negativt, svak positivt (grense) og positivt kontrollserum. For analyser med over 25 prøver anbefaler vi å fylle de tre siste brønnene med kontrollserum som et duplikat.

Fyll de resterende brønnene med de fortynnede prøvene (100 µl hver).

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern serumene og vask 4 ganger med ~ 250 µl vaskeløsning.

Trinn 3: Inkubasjon med konjugat:

Distribuer 100 µl fortynnet konjugat i hver brønn (inkludert ingen-serum blank).

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern konjugatet og vask 4 ganger med ~ 250 µl vaskeløsning.

Trinn 4: Inkubasjon med substrat:

Distribuer 100 µl substratløsning per brønn.

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Stopp reaksjonen ved å tilsette 100 µl stoppende løsning i hver brønn.

Trinn 5: Måling av absorbanser:

Dersom nødvendig, tørk bunnen av brønnene og fjern bobler. Mål absorbansene ved 405 nm innen 1 time etter tilsetning av stoppende løsning.

Tolkning:

Trekk verdien av ingen-serum blank fra alle målte verdier. Når det er aktuelt, beregn gjennomsnittlige absorbansverdier for dupliserte serumkontroller. Testen er gyldig hvis følgende kriterier er oppfylt:

- Absorbans (A) av positiv kontroll > 1.200
- A av svak positiv kontroll > 8 % av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 8 % av A av positiv kontroll
- A av ingen-serum blank < 0.350

Dersom prøven gir signal som overskrider mikroplateleserens måleområde, bør verdien som tilsvarer leserens øvre måleområde tilskrives.

Kvalitetskontroller for gjeldende partier publiseres på nettsiden vår: www.bordier.ch

Antistoffkonsentrasjonen av svak positivt (grense) serum 9650-07 er satt for å diskriminere optimalt mellom serum fra klinisk dokumenterte tilfeller av fascioliasis og friskt humant serum.

Grenseindeksen til en prøve defineres, etter subtrahering av ikke-serum blank, som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{Absorbansprøve}}{\text{Absorbansgrense serum}}$$

Resultatet er **negativt** når indeksen til den analyserte prøven er lavere enn 1,0. I dette tilfellet er IgG antistoffkonsentrasjonen mot *Fasciola hepatica*-antigener klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er **positivt** når indeksen til den analyserte prøven er høyere eller lik 1,0. I dette tilfellet anses IgG antistoffkonsentrasjonen mot *Fasciola hepatica*-antigener som klinisk signifikant. Det indikerer at pasienten har hatt kontakt med parasitten.

En gråsone kan defineres av hvert laboratorium i henhold til dets pasientpopulasjon. I tilfelle av grensetilfeller eller tvilsomme resultater, anbefaler vi å gjenta testen 2–4 uker senere med en fersk prøve.

I tilfelle av positivt eller tvilsomt resultat anbefaler vi å utføre en bekreftelsestest (oftest ved western-blot) hvis en slik test er tilgjengelig eller kreves av nasjonale forskrifter.

Analytiske ytelser:

Analytisk spesifisitet:

En spesifisitet på 97 % ble funnet med 30 serum fra pasienter med andre parasittiske infeksjoner. Kryssreaktivitet oppstår hovedsakelig hos pasienter med alveolær echinokokkose.

Ingen positiv eller negativ interferens ble observert med supraphysiologiske konsentrasjoner av hemoglobin, lipider eller bilirubin i serum som var supplert med interferenter.

Presisjon:

Repetisjonsnøyaktighet ble vurdert ved å teste 2 humane serumprøver i 24 brønner på 1 test.

Reproduserbarhet ble vurdert ved å teste de 2 humane serumprøvene i duplikat på 10 forskjellige analyser.

	Repetisjonsnøyaktighet		Reproduserbarhet	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gjennomsnitt (absorbans)	0,459	1,491	0,469	1,547
Standardavvik (absorbans)	0,023	0,089	0,029	0,095
Variasjonskoeffisient (%)	5,0	6,0	6,2	6,1

Kliniske ytelser:

Diagnostisk sensitivitet:

En sensitivitet på 77 % ble funnet med 13 serum fra pasienter som lider av fascioliasis.

Diagnostisk spesifisitet:

En spesifisitet på 99 % ble funnet med 99 serum fra blodgivere (sveitsisk). En spesifisitet på 98 % ble funnet med 100 serum fra pasienter av en infeksjonshet (sveitsisk).

Positiv og negativ prediktiv verdi:

En PPV på 77 % og en NPV på 98 % ble funnet hos de nevnte populasjonene ovenfor.

Forventede verdier i normale og rammede populasjoner:

I en normal populasjon av 99 sveitsiske blodgivere og 100 serum fra en sveitsisk infeksjonshet, er den forventede indeksverdien 0,46. I en rammet populasjon med 13 serum fra pasienter som lider av fascioliasis, er den forventede indeksverdien 5,01.

Hendelser:

Enhver alvorlig hendelse som oppstår i forbindelse med enheten skal meldes til produsenten og til den kompetente myndigheten i medlemsstaten der brukeren og/eller pasienten er etablert.

Begrensninger:

Diagnosen av en smittsom sykdom bør ikke fastsettes utelukkende på grunnlag av et enkelt testresultat. En presis diagnose bør ta hensyn til endemiske situasjoner, klinisk historikk, symptomatologi, avbildning samt serologiske data.

Hos immunkompromitterte pasienter og nyfødte er serologiske data av begrenset verdi.

Referanser:

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

