

Fasciola hepatica IgG ELISA

Immuno-enzymatische test voor de diagnose van fascioliasis bij mensen

96 testen op deelbare strips bedoeld voor in-vitro diagnostisch en professioneel laboratoriumgebruik



Instructies voor het gebruik van het artikel N° 9650
N.° reg. CE: CH-201504-0006 - UDI-DI: 07640158219652



Wordt gebruikt voor:

De kit *Fasciola hepatica* IgG ELISA van Bordier is bedoeld voor kwantitatieve detectie van IgG-antilichamen tegen *Fasciola hepatica* in humaan serum. Serologie is een hulpmiddel bij diagnose en kan niet gebruikt worden als enige manier van diagnostisering.

Achtergrond:

Fascioliasis wordt met name veroorzaakt door de trematode *Fasciola hepatica* (leverbot). Mensen kunnen geïnfecteerd raken door het eten van rauwe waterkers of andere waterplanten verontreinigd met het larvestadium van de parasiet. De immature wormen dringen eerst door het leverparenchym, met traumatische leverdysfunctie als gevolg, en later ook naar de galwegen, waar ze zich ontwikkelen tot volwassen wormen die eitjes leggen. In de vroege fase kunnen gastro-intestinale symptomen ontstaan zoals misselijkheid, braken en abdominale pijn/gevoeligheid. Tijdens de chronische fase kunnen klinische manifestaties van gelijksoortige of meer discrete aard optreden, als teken van ontstoken en geblokkeerde galwegen, eventueel intermitterend van aard. Diagnose is op basis van gedetecteerde eitjes in de ontlasting en een positieve serologie.

Principe en presentatie:

De kit bevat al het materiaal dat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare microtitratiestripjes die gesensibiliseerd zijn met recombinante *Fasciola hepatica*-antigenen. Specifieke antilichamen in het monster binden zich aan deze antigenen en door wassen worden onspecifieke antilichamen verwijderd. De aanwezigheid van parasiet-specifieke antilichamen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat. Middels een tweede wasbeurt wordt ongebonden conjugaat verwijderd. Om gebonden antilichamen te detecteren wordt pNPP-substraat toegevoegd, dat bij aanwezigheid van alkalinefosfatase geel kleurt. Kleurintensiteit is in proportie met de hoeveelheid *Fasciola hepatica*-specifieke antilichamen in het monster. Na toevoegen van kaliumfosfaat stopt de reactie. Absorptie bij 405 nm wordt gelezen met gebruik van een ELISA-microplaatlezer.

De test kan uitgevoerd worden met geautomatiseerde systemen, maar dit moet gevalideerd worden door de gebruiker.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

| | | | | |
|--------------------|---------|--|-----|-----------|
| WELL | 9650-01 | Deelbare ELISA strips, gesensibiliseerd met recombinante <i>Fasciola hepatica</i> -antigenen | 96 | wells |
| DILB | 9650-02 | Verdunningsbuffer (10 x geconcentreerd), paars van kleur | 50 | ml |
| WASH | 9650-03 | Wasvloeistof (10 x geconcentreerd) | 50 | ml |
| ENZB | 9650-04 | Enzybuffer | 50 | ml |
| STOP | 9650-05 | Stopoplossing (0,5M K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9650-06 | Negatief controleserum (20x), groene dop | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 9650-07 | Zwak-positief controleserum (drempel, 20 x), gele dop | 200 | µl |
| CONTROL + | 9650-08 | Positief controleserum (20 x), rode dop | 200 | µl |
| CONJ | 9650-09 | Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat (50 x), paarse dop | 300 | µl |
| SUBS | 9650-10 | Fosfatasesubstraat (para-nitrofenylfosfaat) | 20 | tabletten |
| | | Multipipet reservoir, 25 ml | 1 | stuks |
| | | Kader voor ELISA 8-wellshouder | 1 | stuks |

Bewaar condities:

Bewaar de kit bij 2-8°C (transport bij kamertemperatuur), vermijd langdurige blootstelling van de bestanddelen aan direct licht. Vervaldatum en productienummer van de kit staan vermeld op de zijkant van de doos. Na openen zijn alle reagens tot aan de vervaldatum stabiel, mits bewaard bij 2-8°C.

Benodigd materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (ml en µl). Bakjes. Verdunningstubes voor sera. Plakband voor afdekken van de stripjes tijdens incubatie. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op 37°C. ELISA lezer afgesteld op 405 nm. Handmatige of geautomatiseerde apparatuur voor het afspoelen van de wells. Vortexmixer. Timer.

Vorbereiding van de reagens:

Laat alle reagens op kamertemperatuur komen en vermeng voor gebruik.

ELISA strips: open de zijkant van aluminiumzak 9650-01 en neem het aantal benodigde strips eruit (eentje voor serumvrije blanco, drie voor controles, plus het aantal monsters). Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8-wells-houder(s). Vul de lege plekken van de houder zo nodig met gebruikte wells. Plaats de houder(s) in de juiste richting in de lijst. Hersluit de geopende verpakking met silicagel kussentje.

Verdunningsbuffer: verdun de geconcentreerde verdunningsvloeistof (10 x) 9650-02, 1:10 met gedestilleerd water. Dit wordt gebruikt voor verdunning van controles, monsters en conjugaat. De verdunningsvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Wasoplossing: verdun de geconcentreerde wasoplossing (10 x) 9650-03, 1:10 met gedestilleerd water. U kunt ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Vermijd het gebruik van fosfaat-houdende buffers, aangezien dit de enzymatische activiteit van alkalische fosfatase kan verhinderen. De verdunde wasvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Controlesera: verdun 10 µl controlesera 9650-06 tot -08 in 190 µl verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:20). Het verdunde controleserum is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Conjugaat: verdun conjugaat 9650-09 met verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:50). Verdun conjugaat op de testdag zelf. Het verdunde conjugaat niet bewaren.

Substraatoplossing: los de tablet(ten) fosfatesubstraat 9650-10 op in de onverdunde enzymbuffer 9650-04 (1 tablet in 2,5 ml buffer). Vortex tot de tablet(ten) volledig is/zijn opgelost. Verdun het substraat op de testdag zelf en bescherm het buisje tegen direct licht. Tabletten en substraatoplossingen dienen kleurloos of hooguit lichtgeel van kleur te zijn. Kleurt een tablet of substraatoplossing geel, dan kan het deels gehydrolyseerd zijn en dient weggegooid te worden. De substraatoplossing niet bewaren.

Stopoplossing: gebruik reagens 9650-05 onverdund.

Monstercollectie en voorbereiding:

Gebruik humaan serum. Als het serum binnen enkele dagen geanalyseerd wordt dient het bewaard te worden bij 2-8°C, zo niet, dan bewaren bij -20°C of lager. Vermijd herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Vortex de monsters en verdun tot 1:201 in verdunningsbuffer (bijv. 5 µl monster in 1,0 ml).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen:

Toxische bestanddelen in de volgende concentraties:

| Bestanddeel | Referentie | Natriumazide (N _a N ₃) | Thiomersal |
|--------------------------|-----------------|---|------------|
| Verdunningsbuffer (10 x) | 9650-02 | 0,1% | 0,02% |
| Wasoplossing (10 x) | 9650-03 | 0,05% | / |
| Enzymbuffer | 9650-04 | 0,01% | / |
| Controlesera (20 x) | 9650-06 tot -08 | 0,1% | 0,02% |
| Conjugaat (50 x) | 9650-09 | 0,1% | / |

In de gebruikte concentraties zijn er voor natriumazide en thiomersal geen toxicologische risico's als gevolg van aanraking met huid of slijmvliezen.

- Stopoplossing 9650-05 (0,5 M K₃PO₄) kan irritatie geven.
- De negatieve, zwak-positieve en positieve controlesera (9650-06 tot -08) zijn afkomstig van konijnen.
- Behandel alle reagens en monsters als potentieel geïnfecteerd materiaal.
- Gebruik niet de reagens van andere partijen of andere Bordier ELISA-kits.
- Gebruik geen reagens van andere fabrikanten met reagens voor deze kit.
- Gebruik geen reagens waarvan de vervaldatum is verlopen.
- Sluit de ampullen reagens direct na gebruik stevig af. Gebruik voor elk ampul uitsluitend de bijbehorende dop (niet de dop van andere ampullen). Dit om verontreiniging te voorkomen.
- Gebruik voor elk monster een eigen en schoon pipettipje.
- De microwells niet hergebruiken.
- Voorkom verslechtering van de microwells door mechanische actie (tips/kegels, nozzles).
- De beschrijvingen van symbolen die op de etiketten worden gebruikt, zijn te vinden op de website www.bordier.ch.

Wegwerpbeleid:

Alle materialen zoals gebruikt bij deze test worden gezien als gevaarlijke afvalstoffen. Raadpleeg de landelijke en regionale wet- en regelgeving voor het verwijderen van gevaarlijk afval.

Methode:

Voorkom tijdens de testfase luchtbelvorming in de wells.

Stap 1: Blokkage:

Vul de wells volledig met verdunningsbuffer.

Incubeer gedurende 5 tot 15 minuten bij kamertemperatuur (blokkage).

Verwijder de verdunningsbuffer door afzuigen of leegschudden van de wells boven de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met de monsters:

Vul het eerste well van de eerste strip met 100 µl verdunningsbuffer (serumvrije blanco).

Vul de volgende 3 wells met respectievelijk 100 µl verdund negatief, zwak-positief (drempel) en positief controleserum. Voor testen met meer dan 25 monsters is het advies om de drie laatste wells als duplicaat met controlesera te vullen.

Vul de resterende wells met de verdunde monsters (100 µl per stuk).

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Verwijder de sera en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Vul elk well (inclusief serumvrije blanco) met 100 µl verdund conjugaat.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Vul elk well met 100 µl substraatoplossing.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Stop de reactie door aan elk well 100 µl stopoplossing toe te voegen.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog zo nodig de onderkant van de wells en verwijder luchtbelletjes. Meet absorptie bij 405 nm binnen 1 uur na toevoegen van de stopoplossing.

Interpretatie:

Trek de waarde van de serumvrije blanco van alle gemeten waarden af. Bereken indien van toepassing de gemiddelde absorptiewaarde van de herhaalde serumcontroles. De test is betrouwbaar als deze aan de volgende criteria voldoet:

- Absorptie (A) van de positieve controle > 1,200
- A van zwakke positieve controle > 8% A van positieve controle
- A van de negatieve controle < 8% van A van de positieve controle
- A van serumvrije blanco < 0,350

Kwaliteitscontroles van de huidige partijen kunt u vinden op onze website: www.bordier.ch.

De titer van het zwak-positief serum 9650-07 (drempel) wordt vastgesteld om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van fascioliasis en normaal menselijk serum optimaal te duiden. De drempelwaarde van een monster wordt, na aftrekken van de serumvrije blanco, als volgt gedefinieerd:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorptie monster}}{\text{Absorptie zwak-positief (drempel) serum}}$$

Het resultaat is **negatief** als de index van het geanalyseerde monster lager is dan **1,0**. In dat geval is de titer van de IgG-antilichamen tegen *Fasciola hepatica*-antigenen klinisch niet significant.

Het resultaat is **positief** als de index van het geanalyseerde monster hoger is dan **1,0**. In dat geval wordt de titer van de IgG-antilichamen tegen *Fasciola hepatica*-antigenen als klinisch significant gezien. Dit betekent dat de patiënt in contact is geweest met de parasiet.

Op basis van haar patiëntenpopulatie kan elk laboratorium een grijs gebied bepalen. In geval van twijfelachtige of borderline resultaten is het advies om de test 2-4 weken later met een vers monster te herhalen.

In geval van een positief of twijfelachtig resultaat raden wij aan een bevestigingstest uit te voeren (meestal door western blot) indien een dergelijke test beschikbaar of vereist is volgens de nationale regelgeving.

Analytische prestaties:

Analytische specificiteit:

Een specificiteit van 97% werd gevonden bij 30 sera van patiënten met andere parasitaire infecties. Kruisreactiviteit komt voornamelijk voor bij patiënten met alveolaire echinokokkose.

Er werd geen positieve of negatieve interferentie waargenomen met suprafysiologische concentraties hemoglobine, lipiden of bilirubine in sera aangevuld met interfererende stoffen.

Nauwkeurigheid:

Herhaalbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 humane sera in 24 wells in één enkel experiment.

Reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

| | Herhaalbaarheid | | Reproduceerbaarheid | |
|---------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------|-----------|
| | Monster 1 | Monster 2 | Monster 1 | Monster 2 |
| Gemiddeld (absorptie) | 0,459 | 1,491 | 0,469 | 1,547 |
| Standaardafwijking (absorptie) | 0,023 | 0,089 | 0,028 | 0,069 |
| Variatiecoëfficiënt (%) | 5,0 | 6,0 | 5,9 | 4,5 |

De volgende prestaties kunnen niet worden beoordeeld omdat er geen gecertificeerd referentiemateriaal voor deze analyse bestaat:

- Analytische gevoeligheid (grenzen van detectie en kwantificatie)
- Nauwkeurigheid
- Juistheid
- Meetbereik
- Lineariteit

Klinische prestaties:

Diagnostische gevoeligheid:

Een gevoeligheid van 77% werd gevonden bij 13 sera van patiënten met fasciolose.

Diagnostische specificiteit:

Een specificiteit van 99% werd gevonden bij 99 sera van (Zwitserse) bloeddonoren. Een specificiteit van 98% werd gevonden met 100 sera van patiënten van een (Zwitserse) infectiologie-eenheid.

Positieve en negatieve voorspellende waarde:

Een PPV van 77% en een NPV van 98% werden gevonden met de bovengenoemde populaties.

Verwachte waarden bij normale en getroffen populaties:

In een normale populatie van 99 Zwitserse bloeddonoren en 100 sera van een Zwitserse infectiologie-eenheid is de verwachte indexwaarde 0,46. In een getroffen populatie van 13 sera bij patiënten met fasciolose is de verwachte indexwaarde 5,01.

Incidenten :

Elk ernstig incident in verband met het apparaat moet worden gemeld aan de fabrikant en aan de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

Beperkingen:

Eén enkele testuitslag is niet voldoende om een infectieziekte te diagnosticeren. Een exacte diagnose dient tevens rekening te houden met de endemische context, klinische voorgeschiedenis, symptomatologie, beeldvorming en serologische data.

De waarde van serologische data bij pasgeborenen en patiënten met immunodeficiëntie is beperkt.

Referenties:

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

