

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej alveolárnej echinokokózy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. 9300
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/01757



Plánované použitie:

Sérologická diagnóza (IgG) ľudskej alveolárnej echinokokózy (AHD).
Séro-epidemiologické prieskumy a vyšetrenia ohrozených osôb v dôsledku vystavenia sa danej infekcii.
Pooperačné kontroly.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitizedovaných antigénmi Em2-Em18 *Echinococcus multilocularis*. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalického fosfatázy. Senzitizedované platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9300-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedované antigénmi Em2-Em18 <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	jamky
DILB	9300-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9300-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9300-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9300-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9300-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9300-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9300-09	Proteín A – konjugát alkalického fosfatázy	300	µl
SUBS	9300-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μ l). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9300-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. 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 vysúšacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9300-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9300-03, 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 alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μ l kontrolných sér 9300-06 až -08 v 190 μ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μ l séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9300-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9300-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9300-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9300-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9300-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9300-02, 9300-03, 9300-04 a 9300-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 9300-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9300-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9300-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9300-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9300-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9300-09 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9300-06 až -08 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9300-10 + 9200-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrášením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

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

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

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:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 15 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9300-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov alveolárnej echinokokózy a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9300-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom Em2-Em18 *Echinococcus multilocularis* klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9300-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom Em2-Em18 *Echinococcus multilocularis* považovaná za klinicky významnú.

Citlivosť a presnosť testu:

Diagnostická citlivosť 83 % bola spozorovaná na skupine 151 pacientov s alveolárnou echinokokózou (*Echinococcus multilocularis*). Približne 84 % (n = 63) cystických echinokokóz (*E. granulosus*) preukázal tento test ako negatívne.

Bola testovaná presnosť testu so sérami pacientov s inými parazitózami. Výsledky boli negatívne, s 93 % presnosťou u pacientov s inými helmintiázami (n = 46). 267 sér krvných darcov (švajčiarskych) bolo 98 % negatívnych. Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu. Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.647	1.518	0.580	1.407
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.033	0.058	0.026	0.064
Variačný koeficient (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Odkazy na použitú literatúru:

Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. **36** : 151-160.

Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S. and Eckert, J. (1993) Improved primary immunodiagnosis of alveolar Echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. J. Clin. Microbiol. **31** : 373-376.

Eckert, J., Conraths, F. and Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int. J. Parasitol. **30** : 1283-1294.

Müller, N., Frei, E., Nuñez, S. and Gottstein, B. (2006) Improved serodiagnosis of alveolar echinococcosis of humans using an in vitro-produced *Echinococcus multilocularis* antigen. Parasitology. **134** : 1-10.

Knapp, J., Sako, Y., Grenouillet, F., Bresson-Hadni, S., Richou, C., Gbaguidi-Haore, H., Ito, A., Millon, L. (2014) Comparison of the serological tests ICT and ELISA for the diagnosis of alveolar echinococcosis in France. Parasite. **21**.



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

