

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga alveolär echinococcosis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9300
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) hos mänskliga alveolär echinococcosis (Alveolära Hydatid sjukdom). Seroepidemiologiska studier och undersökning av personer i riskzon, efter exponering för infektion. Postoperativ kontroll.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska prövningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 prövningar):

WELL	9300-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18 antigener	96	brunnar
DILB	9300-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9300-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9300-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9300-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9300-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9300-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9300-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9300-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9300-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9300-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9300-03, i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 9300-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9300-09, 1/51 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9300-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9300-10 i utspädd buffert. 9300-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9300-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9300-02, 9300-03, 9300-04 och 9300-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_aN_3). Lösning 9300-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9300-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9300-06 till -08) är från kaniner.

Volymmer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9300-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9300-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9300-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9300-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9300-10 + 9300-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 15 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9300-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av alveolär echinococcosis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9300-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot ***Echinococcus multilocularis*** Em2-Em18 antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9300-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot ***Echinococcus multilocularis*** Em2-Em18E/S antigen anses vara kliniskt signifikant.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

Den diagnostiska känsligheten av 83% hittades i en grupp av 151 patienter med alveolär echinococcosis (*Echinococcus multilocularis*). Ungefär 84% (n=63) av cystisk echinococcoses (E. granulosus) är negativ med testet.

Specificiteten av analysen med sera från patienter med andra parasitosis var testad. Resultaten var negativa med 93 % av patienterna med andra helminthiaser (n=46). 267 bloddonator (swiss) av sera vad negative på 98%. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys. Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0.647	1.518	0.580	1.407
Standardavvikelse (absorbans)	0.033	0.058	0.026	0.064
Variationskoefficient (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Referenser:

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

Biochema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

