

# ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu alveolární echinokokózy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. 9300  
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/01757



## Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) alveolární echinokokózy u lidí (alveolární echinokokové onemocnění).

Séro-epidemiologické průzkumy a vyšetření ohrožených osob následované expozicí vůči infekci. Post operativní kontroly.

## Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících antigeny *Echinococcus multilocularis* Em2–Em18. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Senzitivované destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

## Materiály v sadě (96 analýz):

<b>WELL</b>	9300-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18	96	destiček
<b>DILB</b>	9300-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9300-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9300-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9300-05	Zastavovací roztok (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9300-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9300-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9300-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
<b>CONJ</b>	9300-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
<b>SUBS</b>	9300-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

## Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

## 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.

## Příprava činidel před použitím:

**Destičky ELISA:** otevřete bok hliníkové tašky 9300-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. 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 s polštářkem proti vlhkosti.

**Tlumicí roztok na ředění:** zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9300-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

**Vyplachovací roztok:** zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9300-03 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.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 µl kontrolního séra 9300-06 na -08 ve 190 µl tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

**Testované sérum:** zředte 10 µl séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9300-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

**Roztok substrátu:** předehejte enzymatický tlumicí roztok 9300-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9300-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9300-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

**Zastavovací roztok:** použijte neředěné činidlo 9300-05.



**Varování a bezpečnostní opatření:** Roztoky 9300-02, 9300-03, 9300-04 a 9300-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného ( $\text{NaN}_3$ ). Roztok 9300-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9300-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9300-06 až -08) pochází z králíků.

## Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Tlumicí roztok na ředění (10 x)</b>	9300-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Vyplachovací roztok (10 x)</b>	9300-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugát</b>	9300-09 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrolní sérum</b>	9300-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Testované sérum</b>	Sérum + tlumicí roztok na ředění	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Roztok substrátu</b>	9300-10 + 9300-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## Postup:

### Krok 1: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

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

### Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100  $\mu$ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100  $\mu$ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100  $\mu$ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100  $\mu$ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

### Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100  $\mu$ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

### Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100  $\mu$ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100  $\mu$ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

### Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

## Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 15 % A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9300-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů alveolární echinokokózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9300-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenem Em2–Em18 *Echinococcus multilocularis* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9300-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenem Em2–Em18 *Echinococcus multilocularis* považována za klinicky významnou.

## Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost diagnózy 83 % byla zjištěna u skupiny 151 pacientů s alveolární echinokokózou (*Echinococcus multilocularis*). Přibližně 84 % (n = 63) cystických echinokokóz (*E. granulosus*) má tento test negativní.

Specifita analýzy testována pomocí séra z pacientů s dalšími parazitickými onemocněními byla 93 % (n = 46). 267 sér dárců krve (Švýcarsko) bylo negativních s hodnotou 98 %. Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze. Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,647	1,518	0,580	1,407
Standardní odchylka (absorbance)	0,033	0,058	0,026	0,064
Koeficient odchylky (%)	5,1	3,8	4,5	4,6

## Reference:

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<sup>plus</sup> 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.  
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

