

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu alveolární echinokokózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití

Návod k použití pro produkt č. 9300
EC reg. č.: H-CH/CA01/IVD/01757



Předpokládané použití:

Sada ELISA *Echinococcus multilocularis* od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti larvám *Echinococcus multilocularis* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

Pozadí:

Alveolární echinokokóza je způsobena larválním stádiem tasemnice *Echinococcus multilocularis*, druhu, který se vyskytuje u lišek, kojetů, psů a u některých dalších psovitých šelem. Lidé mohou být infikováni neúmyslným požitím vajíčka tasemnice prostřednictvím kontaminované potraviny nebo vody. Larvální forma *E. multilocularis* nedospěje v člověku plně do podoby plodných dospělců, ale v důsledku nepřetržitého bujení článků, které pronikají do okolní tkáně a ničí ji podobně jako tumor, dochází k selhání jater. Parazit může pronikat i do dalších orgánů, jako například do plic a do mozku. Hlavními symptomy jsou bolesti v břiše, astenie, hepatomegalie a žloutenka. Diagnóza vychází z technik zobrazení jako například CT, na nichž lze vizuálně pozorovat parazitickou hmotu a příslušné rozptýlené struktury podobné cystám. Ke screeningu ohroženého obyvatelstva se používají sérologické testy a také jako následné testy pro pacienty s alveolární echinokokózou po léčbě.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách zcitlivěných larválními antigeny *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Echinococcus multilocularis* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	9300-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18	96	destiček
DILB	9300-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	50	ml
WASH	9300-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9300-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9300-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	9300-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	9300-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	9300-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	9300-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejich součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

Příprava činidel před použitím:

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 9300-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9300-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Kontrolní sérum: Zředte 10 µl kontrolního séra 9300-06 na -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 9300-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9300-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9300-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

Zastavovací roztok: Použijte neředěné činidlo 9300-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N _a N ₃)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9300-02	0,1 %	0,02 %
Vyplachovací roztok (10 x)	9300-03	0,05 %	/
Tlumicí enzym	9300-04	0,01 %	/
Kontrolní sérum (20 x)	9300-06 až -08	0,1 %	0,02 %
Konjugát (50 x)	9300-09	0,1 %	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 9300-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9300-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

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 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdná).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky bez séra, prázdné).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A negativního kontrolního vzorku < 12 % A pozitivního kontrolního vzorku
- A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

50339_02 9300 Tch 01.2018

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9300-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů alveolární echinokokózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

Citlivost a specificita:

Citlivost 83% byla zjištěna u 151 pacientů trpících parazitem alveolární echinokokózy. Specificita 98% byla zjištěna u 267 sér dárců krve (Švýcarsko).

Interference:

Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Upřesnění:

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

Omezení:

Specificita 84% byla zjištěna u 63 sér pacientů trpících parazitem cystická echinokokózy. Specificita 93% byla zjištěna u 46 sér pacientů s jinými parazitickými infekcemi. Křížová reaktivita se povětšinou vyskytuje u pacientů s trichinelózou, fasciolózou a cysticercózou.

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

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^{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

