

# ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS recEm-18

Enzymatický imunologický test pro sérologické sledování 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. 9310  
EC reg. č.: CH-201708-0010



## Předpokládané použití:

Sada ELISA *Echinococcus multilocularis* od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti larvám antigenu Em-18 *Echinococcus multilocularis* v lidském séru. Tento test je určen k pooperačnímu a post-terapeutickému sledování infikovaných pacientů.

## 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 potravy 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 obsahujících rekombinantními antigeny *Echinococcus multilocularis* Em18. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních mykotických protilátek 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):

|                    |         |  |     |          |
|--------------------|---------|--|-----|----------|
| <b>WELL</b>        | 9310-01 | Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Aspergillus fumigatus</i> | 96  | destiček |
| <b>DILB</b>        | 9310-02 | Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově             | 50  | ml       |
| <b>WASH</b>        | 9310-03 | Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)                                   | 50  | ml       |
| <b>ENZB</b>        | 9310-04 | Enzymatický tlumicí roztok   | 50  | ml       |
| <b>STOP</b>        | 9310-05 | Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )                  | 25  | ml       |
| <b>CONTROL -</b>   | 9310-06 | Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko                             | 200 | μl       |
| <b>CONTROL -/+</b> | 9310-07 | Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko      | 200 | μl       |
| <b>CONTROL +</b>   | 9310-08 | Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko                            | 200 | μl       |
| <b>CONJ</b>        | 9310-09 | Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko             | 300 | μl       |
| <b>SUBS</b>        | 9310-10 | 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 jejích 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 9310-01 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 9310-02 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 9310-03 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 9310-06 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 9310-09 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 9310-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9310-04 (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 9310-05.

### **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 <sub>a</sub> N <sub>3</sub> ) | Merthiolát |
|----------------------------|----------------|---|------------|
| Tlumicí roztok (10 x)      | 9310-02        | 0,1 %   | 0,02 %     |
| Vyplachovací roztok (10 x) | 9310-03        | 0,05 %  | /          |
| Tlumicí enzym              | 9310-04        | 0,01 %  | /          |
| Kontrolní sérum (20 x)     | 9310-06 až -08 | 0,1 %   | 0,02 %     |
| Konjugát (50 x)            | 9310-09        | 0,1 %   | /          |

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

- Zastavovací roztok 9310-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9310-06 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 < 5 % A pozitivního kontrolního vzorku
- A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9310-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů alveolární echinokokózy a sérem zdravých lidí nebo lidí s remisí příznaků. 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* Em-18 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* Em-18 považována za klinicky významnou.

Pokles nebo vymizení hladin protilátek anti-recEm18 v séru indikuje úplnou chirurgickou resekci parazitárního poškození nebo inaktivaci parazita medikamentózní léčbou.

### Citlivost a specificita:

Byly studovány párové vzorky séra před zákrokem a po něm od 12 pacientů s potvrzenou alveolární echinokokózou, kteří absolvovali radikální nebo neradikální chirurgickou léčbu. Před zákrokem mělo 9 pacientů (75%) index >1. 5 z těchto pacientů mělo negativní výsledky po zákroku. Avšak u všech 12 pacientů poklesly hladiny protilátek Em18 v séru a zůstaly významně nižší, než ve vzorcích odebraných před zákrokem. Byly studovány vzorky séra 25 pacientů s potvrzenou alveolární echinokokózou, kteří zákrok neabsolvovali, ale jejichž nemoc byla stabilní pod medikací antiparazitické chemoterapie. 18 (72%) z nich mělo index >1 (střední index 6,3). Byly studovány vzorky séra 7 pacientů s potvrzenou alveolární echinokokózou, kteří zákrok neabsolvovali, ale jejichž nemoc byla progresivní pod medikací antiparazitické chemoterapie. 6 (86%) z nich mělo index >1 (střední index 13,8).

### 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 |
| <b>Průměr (absorbance)</b>              | 0,186          | 1,260    | 0,157              | 1,123    |
| <b>Standardní odchylka (absorbance)</b> | 0,022          | 0,072    | 0,016              | 0,074    |
| <b>Koeficient odchylky (%)</b>          | 11,8           | 5,7      | 10,0               | 6,5      |

### Omezení:

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:

- Ammann, R.W., Rebber, E.C., Gottstein, B., Grimm, F., Eckert, J., Renner, E.L. (2004) Immunosurveillance of alveolar echinococcosis by specific humoral and cellular immune tests: long-term analysis of the Swiss chemotherapy trial (1976-2001). J. Hepatol. **41** : 551-9.
- Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y., Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., Nakao, M., Ito, A., Kern, P. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. Am. J. Trop. Med. Hyg. **80** : 792-7.
- Ishikawa, Y., Sako, Y., Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., Ohsaki, Y., Miyokawa, N., Nakao, M., Nakaya, K., Ito, A. (2009) Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multiorgan involvement by use of recombinant Em18. J. Clin. Microbiol. **47** : 3191-6.
- Tappe, D., Sako, Y., Itoh, S., Frosch, M., Gruner, B., Kern, P., Ito, A. (2010) Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stage. Clin Vaccine Immunol. **17** : 944-8.
- Ammann, R.W., Stumpe, K.D.M., Grimm, F., Deplazes, P., Huber, S., Bertogg, K., et al. (2015) Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-Em18/3-10 serology. PloS Negl Trop Dis. **9**.

### 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

