

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση εχينوκοκκίασης σε άνθρωπο

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια



Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. 9350
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: H-CH/CA01/IVD/01757

Προβλεπόμενη χρήση:

Ορολογική διάγνωση (IgG) ανθρώπινης κυστικής υδατιδικής νόσου (που προκαλείται από *Echinococcus granulosus*). Αυτή η δοκιμή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ορολογική διάγνωση της κυψελιδικής υδατιδικής νόσου (που προκαλείται *Echinococcus multilocularis*). Θετικά και αμφίβολα περιστατικά θα πρέπει να ελεγχθούν εκ νέου με το *Echinococcus multilocularis*-ειδικό Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, Αριθ. προϊόντος 9300) ώστε να εντοπιστούν τα είδη *Echinococcus* που προκαλούν μολύνσεις.

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε υποδοχές μικροτιτλοδότησης ευαισθητοποιημένες με αντιγόνα υδατιδικού υγρού *Echinococcus granulosus*. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ευαισθητοποιημένες υποδοχές παρέχονται ως εύθραυστες ταινίες για την οικονομική δοκιμή μικρών σειρών δειγμάτων.

Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές)

WELL	9350-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με αντιγόνα (υδατιδικό υγρό) <i>Echinococcus granulosus</i>	96	φρεάτια
DILB	9350-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
WASH	9350-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
ENZB	9350-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
STOP	9350-05	Ανασχετικό διάλυμα (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONTROL -/+	9350-07	Ασθενής θετικός ορός (διακοπή)	200	μl
CONTROL +	9350-08	Θετικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONJ	9350-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης	300	μl
SUBS	9350-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης	20	δισκία
		Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml	1	τεμάχιο
		Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	1	τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8° C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού.

Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και μ l). Φιάλες. Σωλήνες για την αραιώση του ορού. Κολητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37° C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9350-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται. Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9350-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα πλύσης: αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9350-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Αρνητικός, ασθενής θετικός (διακοπή) και θετικός ορός μάρτυρα: αραιώστε 10 μ l ορού μάρτυρα 9350-06 έως -08 σε 190 μ l ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/20).

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 μ l ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201).

Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης: αραιώστε σύζευγμα 9350-09, σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/51).

Διάλυμα υποστρώματος: προθερμάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9350-04 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν την προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια ELISA, διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9350-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 9350-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων).

Ανασχητικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9350-05 μη αραιωμένο.



Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα: Τα διαλύματα 9350-02, 9350-03, 9350-04 και 9350-09 περιέχουν αντίστοιχα 0,1%, 0,05%, 0,01% και 0,1% αζίδιο του νατρίου (N_3Na). Το διάλυμα 9350-02 περιέχει 0,02% μερθειολικού. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές. Το ανασχητικό διάλυμα 9350-05 (0,5 M K_3PO_4) είναι ερεθιστικό.

Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9350-06 έως -08) είναι από κουνέλια.

Όγκοι προς προετοιμασία:

			Συνολικός αριθμός φρεατίων προς χρήση			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)	9350-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9350-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Σύζευγμα	9350-09 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Ορός μάρτυρα	9350-06 έως -08 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Οροί προς δοκιμή	Ορός + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Διάλυμα υποστρώματος	9350-10 + 9350-04	δισκ. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Διαδικασία:

Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης.

Επώαστε για 5 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικό, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα (100 μl το καθένα).

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τους αραιωμένους ορούς προς δοκιμή (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης σε κάθε φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 4: Επώαστε με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων, εξαλείψτε τις φυσαλίδες και μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm.

Ερμηνεία

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200, A του αρνητικού μάρτυρα < 12 % του A του θετικού μάρτυρα, A κενό έναντι αέρα < 0,350.

Η συγκέντρωση αντισωμάτων του ασθενούς θετικού (διακοπή) ορού 9350-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλτιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις κυστικής υδατιδικής νόσου και υγιείς ανθρώπινους ορούς.

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9350-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνου *E. granulosus* είναι κλινικώς μη σημαντική.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9350-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνου *E. granulosus* θεωρείται κλινικώς σημαντική.

Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Εντοπίστηκε διαγνωστική ευαισθησία 96 % σε ομάδα 24 ασθενών με κυστική υδατιδική νόσο (*Echinococcus granulosus*). Οι περισσότεροι ασθενείς (90 %) με κυψελιδική υδατιδική νόσο (*Echinococcus multilocularis*) βρέθηκαν επίσης θετικοί σε αυτή τη δοκιμή.

Η εξειδίκευση της δοκιμής με ορούς από ασθενείς με άλλες παρασιτώσεις ελέγχθηκε. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά με το 82% των ασθενών με ελμινθιάσεις (n = 51) και 83% με πρωτοζωώσεις (n = 23). 150 των ορών αιμοδοτών (Ελβετικοί) ήταν αρνητικοί στο 97 %. Η εσωτερική αξιολόγηση έδειξε ότι αιμορραγικοί, λιπαιμικοί και ικτερικοί οροί δεν παρεμβαίνουν με τα αποτελέσματα της δοκιμής.

Εντός του σύνηθες εύρους δειγμάτων που αναλύονται σε ένα ευρωπαϊκό εργαστήριο, η προγνωστική τιμή ενός αρνητικού αποτελέσματος είναι κοντά στο 100%. Αντιθέτως, ένα θετικό αποτέλεσμα πρέπει να επιβεβαιώνεται σε όλες τις περιπτώσεις με πιο συγκεκριμένες δοκιμές (Em2-Em18 και έρευνα για αντισώματα αντι-8 Kd μέσω ανοσοαποτύπωσης).

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή. Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (απορρόφηση)	0,586	1,416	0,684	1,654
Τυπική απόκλιση (απορρόφηση)	0,027	0,064	0,024	0,079
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	4,6	4,5	3,5	4,8

Αναφορές:

Gottstein, B. (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. **5** : 248-261.

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.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **60**: 193-198.



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

