

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej echinokokózy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. 9350
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/01757



Plánované použitie:

Sérologická diagnóza (IgG) cystickej hydatidózy (spôsobenej druhom *Echinococcus granulosus*). Tento test môže byť taktiež použitý na sérologickú diagnózu alveolárnej hydatidózy (spôsobenej druhom *Echinococcus multilocularis*). Pozitívne a neisté prípady by mali byť znovu testované špecifickým testom na *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, artikkel č. 9300), aby sa určil infikujúci druh *Echinococcus*.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitizedých antigénom hydatidného moku *Echinococcus granulosus*. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalického fosfatázy. Senzitizedé platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9350-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedé antigénom <i>Echinococcus granulosus</i> (hydatidný mok)	96	jamky
DILB	9350-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9350-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9350-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9350-09	Proteín A – konjugát alkalického fosfatázy	300	µl
SUBS	9350-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μl). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9350-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9350-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9350-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μl kontrolných sér 9350-06 až -08 v 190 μl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μl séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9350-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9350-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9350-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9350-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9350-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9350-02, 9350-03, 9350-04 a 9350-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 9350-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9350-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9350-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9350-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9350-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9350-09 + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9350-06 až -08 + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9350-10 + 9350-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 12 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9350-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov cystickej hydatidózy a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9350-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénu *Echinococcus granulosus* klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9350-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénu *Echinococcus granulosus* považovaná za klinicky významnú.

Citlivosť a presnosť testu:

Diagnostická citlivosť vo výške 96 % bola spozorovaná na skupine 24 pacientov s cystickou hydatidózou (*Echinococcus granulosus*). Väčšina pacientov (90 %) s alveolárnou hydatidózou (*Echinococcus multilocularis*) boli týmto testom tiež určené ako pozitívni.

Bola testovaná presnosť testu so sérami pacientov s inými parazitózami. Výsledky boli negatívne u 82 % pacientov s helmintiázami (n = 51) a u 83 % pacientov s prvokovými infekciami (n = 23). 150 sér krvných darcov (švajčiarskych) bolo na 97 % negatívnych. Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

V bežnom rozmedzí vzoriek analyzovaných v európskych laboratóriách sa prediktívna hodnota negatívneho výsledku blíži k 100 %. Naopak, pozitívny výsledok musí byť u všetkých prípadov potvrdený špecifickejšími testami (Em2-Em18 a vyhľadanie anti-8 Kd protilátok immunoblotom).

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu. Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.586	1.416	0.684	1.654
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.027	0.064	0.024	0.079
Variačný koeficient (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Odkazy na použitú literatúru:

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

Biochema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

