

# ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af humane ekinokokker

96 analyser på særskilte brønde



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9350

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757

## Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af human cystisk hydatid sygdom (forårsaget af *Echinococcus granulosus*). Denne analyse kan også anvendes til alveolær hydatid sygdom (forårsaget af *Echinococcus multilocularis*). Positive and tvivlsomme tilfælde bør gentestes med *Echinococcus multilocularis* - specifikt Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, article N° 9300) for at identificere de inficerende *Echinococcus* arter.

## Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Echinococcus granulosus* hydatid væske antigen. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

## Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

<b>WELL</b>	9350-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Echinococcus granulosus</i> antigen (hydatid væske)	96	brønde
<b>DILB</b>	9350-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
<b>WASH</b>	9350-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9350-04	Enzymbuffer	50	ml
<b>STOP</b>	9350-05	Stopløsning (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9350-06	Negativt kontrolserum	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9350-07	Svagt positivt serum (afskåret)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9350-08	Positivt kontrolserum	200	µl
<b>CONJ</b>	9350-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
<b>SUBS</b>	9350-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

## Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

50435\_01 9350 Dan 02.2016

## Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and  $\mu\text{l}$ ). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

## Klargøring af reagens inden anvendelse:

**Elisa brønde:** åbn siden af aluminiumstasken 9350-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

**Fortyndingsbuffer:** fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9350-02, 1/10 i destilleret vand.

**Vaskeløsning:** fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9350-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10  $\mu\text{l}$  kontrolsera 9350-06 til -08 i 190  $\mu\text{l}$  fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

**Sera, som skal testes:** fortynd 10  $\mu\text{l}$  serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9350-09, i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

**Substratløsning:** forvarm enzymbuffer 9350-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9350-10 i ufortyndet buffer 9350-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

**Stopløsning:** anvend reagens 9350-05 ufortyndet.



**Advarsler og sikkerhedshensyn:** Løsninger 9350-02, 9350-03, 9350-04 og 9350-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid ( $\text{N}_3\text{Na}$ ). Løsning 9350-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9350-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9350-06 til -8) er fra kaniner.

## Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Fortyndingsbuffer (10 x)</b>	9350-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Vaskeløsning (10 x)</b>	9350-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugat</b>	9350-09 + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrolsera</b>	9350-06 til -8 + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Sera, som skal testes</b>	Serum + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Substratløsning</b>	9350-10 + 9350-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## **Procedure:**

### **Trin 1: Blokering:**

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

### **Trin 2: Inkubation med serumprøver:**

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 3: Inkubation med konjugat:**

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 4: Inkubation med substrat:**

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

### **Trin 5: Måling af absorbanser:**

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

## Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 12 % af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9350-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af cystisk hydatid sygdom og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9350-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Echinococcus granulosus** antigen klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af det svagt positive serum 9350-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Echinococcus granulosus** antigen for at være klinisk signifikant.

## Analysens sensitivitet og specificitet:

En diagnostisk sensitivitet på 96% blev fundet i en gruppe på 24 patienter med cystisk hydatid sygdom (*Echinococcus granulosus*). De fleste patienter (90%) med alveolær hydatid sygdom (*Echinococcus multilocularis*) blev også fundet positive med denne analyse.

Specificiteten af analysen med sera fra patienter med andre parasitoser blev testet. Resultaterne var negative med 82% af patienterne med andre helminthiasis (n=51) og 83% med protozooses (n = 23). 150 sera fra bloddonorer (schweiziske) var negative på 97%. Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Indenfor det sædvanlige område for prøver analyseret i et europæisk laboratorium er den prædiktive værdi af et negativt resultat tæt på 100%. I kontrast hertil skal et positivt resultat bekræftes i alle sager med mere specifikke analyser (Em2-Em18 og søgning efter anti-8 Kd antistoffer med immunoblot).

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	0,586	1,416	0,684	1,654
Standardafvigelse (absorbans)	0,027	0,064	0,024	0,079
Variationskoefficient (%)	4,6	4,5	3,5	4,8

## Referencer:

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<sup>plus</sup> 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

