

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human ekinokokkose

96 analyser på særskilte brønde til in vitro diagnostisk brug og til professionel laboratoriebrug

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9350
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Tilsigtet anvendelse:

Bordier Echinococcus granulosus ELISA kit er beregnet til kvantitativ påvisning af IgG antistoffer mod *Echinococcus granulosus* (og *Echinococcus multilocularis*) i humant serum. Serologi er en hjælp til diagnose og kan ikke bruges som eneste diagnosemetode.

Baggrund:

Cystisk ekinokokkose, også kendt som hydatidsygdom, skyldes larvestadiet af *Echinococcus granulosus*, en båndorm, der findes hos hunde. Får, kvæg, geder og svin der er mellemværter har hydatidcyster i hovedsagelig lever og lunger. Mennesker kan blive inficeret ved at indtage ulemper båndorm æg i forurenede jord, mad eller vand. Parasitlarverne udvikler sig senere til hydatidcyster hovedsagelig også i lever og lunger. De vigtigste symptomer vises, når hydatidcyster vokser store nok til at forårsage organ dysfunktion plus ubehag, smerte, kvalme og opkastning. Diagnosen er baseret på billedbehandlingsteknikker, såsom CT-scanninger, ultralyd og MR til at detektere tilstedeværelsen af godt afgrænset cyste (r) hos en person med en eksponeringshistorie og et positivt resultat ved serologisk testning.

Princip og præsentation

Kittet giver alt det materiale som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA), på skrøbelige mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Echinococcus granulosus* hydatidvæske antigen. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Afsløring af bundne antistoffer vil ske ved tilsætning af pNPP substrat, som bliver gul i nærvær af alkalisk phosphatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Echinococcus granulosus*-specifikke antistoffer i prøven. Kaliumphosphat tilsættes for at stoppe reaktionen. Absorbans ved 405 nm læses ved anvendelse af en ELISA mikroplade læser.

Prøven kan udføres med automatiske systemer, men dette skal valideres af brugeren.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9350-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Echinococcus granulosus</i> hydatidvæske antigen	96	brønde	
DILB	9350-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml	
WASH	9350-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml	
ENZB	9350-04	Enzym buffer	50	ml	
STOP	9350-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml	
CONTROL	-	9350-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL	-/+	9350-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL	+	9350-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ	9350-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl	
SUBS	9350-10	Fosfatase-substrat (Para-nitrophenylphosphat)	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), undgå langsigtet eksponering af komponenterne i direkte lys. Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen. Efter første åbning er alle reagenser stabile indtil udløbsdatoen, dette er om de opbevares ved 2-8°C.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and µl). 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. Manuel eller automatisk udstyr til skylning af brønde. Vortex mixer. Timer.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Hold alle reagenser i stuetemperatur og bland dem inden brug.

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9350-01, og tag det nødvendige antal brønde. (en for blankt, tre for kontroller plus antal prøver). 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. Dette anvendes til fortynding af kontroller, prøver og konjugater. Den fortyndede buffer er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

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. Den fortyndede vaskeopløsning er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Kontrolsera: fortynd 10 µl kontrolsera 9350-06 til -08 i 190 µl fortyndingsbufferopløsning (endelig fortynding 1/20). Den fortyndede kontrolsera er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Konjugat: fortyndet konjugat 9350-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9350-10 i ufortyndet enzym buffer 9350-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst. Fortynd substratet på analysedagen og beskyt røret fra direkte lys. Tabletter og substratopløsninger bør være farveløse eller bør kun have en lille gul tinge. Hvis en tablet eller en substratopløsning bliver gul, kan den have været delvis hydrolyseret og bør kasseres. Opbevar ikke substratopløsningen.

Stopløsning: anvend reagens 9350-05 ufortyndet.

Prøveudtagning og forberedelse:

Brug humant serum. Hvis analyseres inden for få dage skal serum skal opbevares ved 2-8°C, ellers opbevares ved -20°C eller lavere. Undgå at gentage frysning og optøning. Vortex prøver og fortynd 1/201 i fortyndingsbufferopløsning (fx 5 µl prøve i 1,0 ml).

Advarsler og sikkerhedshensyn:

Giftige stoffer findes i følgende koncentration:

Komponent	Reference	Natriumazid (N _a N ₃)	Merthiolat
Fortyndingsbuffer (10 x)	9350-02	0.1 %	0.02 %
Vaskeopløsning (10 x)	9350-03	0.05 %	/
Enzymbuffer	9350-04	0.01 %	/
Kontrolsera (20 x)	9350-06 til -08	0.1 %	0.02 %
Konjugat (50 x)	9350-09	0.1 %	/

Ved de anvendte koncentrationer har natriumazid og merthiolat ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinder.

- Stoppløsning 9350-05 (0,5 M K₃PO₄) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9350-06 til -08) er fra kaniner.
- Behandle alle reagenser og prøver som potentielt infektiøst materiale.
- Byt ikke reagenser fra forskellige partier eller Bordier ELISA kits.
- Brug ikke reagenser fra andre producenter med reagenser i dette kit.
- Brug ikke reagenser efter deres udløbsdatoe.
- Luk reagensflasker tæt straks efter brug, og udskift ikke skruehætter for at undgå forurening.
- Brug separate og rene pipetter tips til hver prøve.
- Mikrobrønde må ikke genbruges.

Vedrørende Bortskaffelse:

Alle materialer, der bliver anvendt i denne test, betragtes generelt som farligt affald. Henvi til nationale og regionale love og bestemmelser for bortskaffelse af farligt affald.

Procedure:

Når du kører analysen, undgå at der dannes bobler i brøndene.

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

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

Trin 2: Inkubation med prøver:

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

Fyld de efterfølgende tre brønde med henholdsvis 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrol serum. Til analyser med mere end 25 prøver anbefaler vi at fylde de tre sidste brønde med kontrol sera som et duplikat.

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera prøver (100 µl hver).

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

Fjern sera, og vask 4 x ~ 250 µl med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet konjugat i hver brønd. (inklusive ikke-serumblank).

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

Fjern konjugat, og vask 4 x med ~ 250 µl 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 stoppløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Hvis det er nødvendigt, tør bunden af brøndene af, og fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm. inden for 1 time efter tilsætning af stopopløsning.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Når det er relevant, beregnes de gennemsnitlige absorbansværdier for duplikeret serumkontrol. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt:

- absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200,
- A af negativ kontrol < 10 % af A af positiv kontrol,
- A af blank mod luft < 0,350.

Kvalitetskontrol af aktuelle partier offentliggøres på vores hjemmeside: www.bordier.ch.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9350-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af cystisk echinokokose og sunde, humane sera. Afsnitets afskårne indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serum-blanke som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{absorbans prøve}}{\text{Absorbans afskåret serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når Indeks af den analyserede prøve er lavere end 1.0. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod *Echinococcus granulosus* antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når Indeks af den analyserede prøve er højere end 1.0. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod *Echinococcus granulosus* antigener at være klinisk signifikant. Det indikerer, at patienten har haft kontakt med parasitten.

En grå zone kan defineres af hvert laboratorium i overensstemmelse med dets patientpopulation. I tilfælde af grænseoverskridende eller tvivlsomme resultater anbefaler vi at gentage testen igen 2-4 uger senere med en frisk prøve.

Analysens sensitivitet og specificitet:

En sensitivitet af 96% blev fundet med 24 sera patienter som lider af cystisk echinokokose. En følsomhed på 89% blev fundet med 19 sera patienter, der lider af alveolær echinokokose. Positive og tvivlsomme resultater bør testes med *Echinococcus multilocularis*-specifik Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, artikel-nr. 9300) for at identificere de inficerende Echinococcus-arter. En specificitet på 97% blev fundet med 119 sera bloddonorer (schweiziske).

interferens:

Intern evaluering viste, at hæmoragisk, lipemisk og isterisk serum ikke interfererer med testens resultater.

Præcision:

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

Begrænsninger:

En specificitet på 82% blev fundet hos 74 sera patienter med andre parasitære infektioner. Krydsreaktivitet forekommer hovedsageligt hos patienter med fascioliasis, filariasis, leishmaniasis og cysticercosis.

Diagnose af en smitsom sygdom bør ikke udarbejdes på basis af et enkelt testresultat. En præcis diagnose bør tage hensyn til endemisk situation, klinisk historie, symptomatologi, billeddannelse samt serologiske data.

Hos immunkompromitterede patienter og nyfødte er serologiske data af begrænset værdi.

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^{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

