

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga echinococcoses

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9350

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) hos mänskliga cystisk hydatid sjukdom (orsakad av *Echinococcus granulosus*). Denna analys kan också användas för Alveolära Hydatid sjukdom (orsakad av *Echinococcus multilocularis*) Positiva och tveksamma fall bör analyseras på nytt med *Echinococcus multilocularis*- specifik Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, artikel N° 9300) för att identifiera infekterade *Echinococcus* arter.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Echinococcus granulosus* hydatid vätska antigen. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska prövningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 prövningar):

WELL	9350-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Echinococcus granulosus</i> antigen	96	brunnar
DILB	9350-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9350-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9350-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9350-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9350-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9350-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9350-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9350-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9350-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9350-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 9350-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9350-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9350-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9350-10 i utspädd buffert. 9350-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9350-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9350-02, 9350-03, 9350-04 och 9350-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9350-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9350-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9350-06 till -08) är från kaniner.

Volymmer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9350-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9350-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9350-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9350-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9350-10 + 9350-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 12 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9350-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av Toxocarosis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9350-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Echinococcus Granulosus** antigen är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9200-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Echinococcus Granulosus** antigen anses vara kliniskt signifikant.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

En diagnostisk känslighet av 96% hittades i en grupp av 24 patienter med cystisk hydatid sjukdom (*Echinococcus granulosus*). De flesta patienterna (90 %) med Alveolära Hydatid sjukdom (*Echinococcus multilocularis*) hittades också positiva med denna analys.

Specificiteten av analysen med sera från patienter med andra parasitoses var testad. Resultaten var negativa med 82 % av patienterna med helminthiasis (n=51) and 83 % med protozooses (n = 23). 150 bloddonator (swiss) av sera vad negativa på 97 %. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Inom det vanliga utbudet av prover analyserade i ett europeiskt laboratorium, är det förutsägande värdet av ett negativt resultat nära 100 %. I kontrast, en positiv resultat måste bekräftas i samtliga fall med mera specifika analyser (Em2-Em18 och söka efter anti-8 Kd antikroppar med immunoblot).

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys. Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	prov 1	prov 2	prov 1	prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0.586	1.416	0.684	1.654
Standardavvikelse (absorbans)	0.027	0.064	0.024	0.079
Variationskoefficient (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Referenser:

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

