

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu echinokokózy u lidí

96 analýz na jednotlivých destičkách pro použití in vitro



Pokyny k použití pro produkt č. 9350
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/01757

Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) cystického echinokokového onemocnění u lidí (způsobené *Echinococcus granulosus*). Tuto analýzu lze také využít k sérologické diagnóze alveolárního echinokokového onemocnění (způsobené *Echinococcus multilocularis*). Pozitivní a nejisté případy je nutné opakovaně testovat pomocí specifického *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, produkt č. 9350) k identifikaci infekčního druhu *Echinococcus*.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících antigeny hydatické kapaliny *Echinococcus granulosus*. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9350-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Echinococcus granulosus</i> (hydatická kapalina)	96	destiček
DILB	9350-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9350-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9350-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9350-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9350-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9350-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9350-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zřed'te koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9350-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zřed'te koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9350-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zřed'te 10 μ l kontrolního séra 9350-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zřed'te 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zřed'te konjugát 9350-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9350-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpust'te tablety substrátu fosfatázy 9350-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9350-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9350-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9350-02, 9350-03, 9350-04 a 9350-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (NaN_3). Roztok 9350-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9350-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9350-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9350-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9350-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9350-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9350-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtete hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 12 % A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9350-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů cystického echinokokového onemocnění a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9350-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Echinococcus granulosus** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9350-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Echinococcus granulosus** považována za klinicky významnou.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost diagnózy 96 % byla zjištěna u skupiny 24 pacientů s cystickým echinokokovým onemocněním (*Echinococcus granulosus*). Většina pacientů (90 %) s alveolárním echinokokovým onemocněním (*Echinococcus multilocularis*) byla v analýze také zjištěna jako pozitivní.

Specifita analýzy byla testována pomocí séra z pacientů s dalšími parazitickými onemocněními. Výsledky byly negativní u 82 % pacientů s helmintiázou (n=51) a 83 % s protozoózou (n=23). 150 sér dárců krve (Švýcarsko) bylo negativních s hodnotou 97 %. Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

V obvyklém rozsahu analyzovaných vzorků v evropské laboratoři byla prediktivní hodnota negativního výsledky blízka 100 %. Naopak pozitivní výsledek bylo nutné potvrdit u všech případů pomocí konkrétnějších analýz (Em2-Em18 a hledání protilátek anti-8 Kd pomocí imunoblotu).

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze. Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,586	1,416	0,684	1,654
Standardní odchylka (absorbance)	0,027	0,064	0,024	0,079
Koeficient odchylky (%)	4,6	4,5	3,5	4,8

Reference:

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.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

