

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human alveolær ekinokokkose

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

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9300
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Tilsigtet anvendelse:

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

Baggrund:

Alveolær ekinokokkose er forårsaget af larvestadiet af *Echinococcus multilocularis*, en bændelorm fundet i ræve, coyoter, hunde og nogle andre dyr af hundefamilien. Mennesker kan blive smittet ved et uheld at indtage båndorm æg i forurenede mad eller vand. Larverne af *E. multilocularis* vokser ikke fuldt ud i gødningscyster hos mennesker, men er en kontinuerlig prolifération af vesikler, som invaderer og ødelægger omgivende væv, vil på en tumorlignende måde medføre leverdysfunktion. Parasitten kan spredes i andre organer som lunger og hjerne. De vigtigste symptomer er mavesmerter, asteni, hepatomegali og gulstot. Diagnosen er baseret på billeddannelsesteknikker som CT-scanninger for visuelt at detektere parasitiske masser og respektive diffuse cystlignende strukturer. Serologiske test anvendes til screening af populationer i fare og for opfølgende AE-patienter efter behandling.

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 multilocularis*** Em2-Em18 antigener. 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 fosfatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Echinococcus multilocularis*-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	9300-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18 antigener	96	brønde	
DILB	9300-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml	
WASH	9300-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml	
ENZB	9300-04	Enzym buffer	50	ml	
STOP	9300-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml	
CONTROL	-	9300-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL	-/+	9300-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL	+	9300-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ	9300-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl	
SUBS	9300-10	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 9300-01, 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 9300-02, 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 9300-03, 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 9300-06 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 9300-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9300-10 i ufortyndet enzym buffer 9300-04 (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 9300-05 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)	9300-02	0.1 %	0.02 %
Vaskeopløsning (10 x)	9300-03	0.05 %	/
Enzymbuffer	9300-04	0.01 %	/
Kontrolsera (20 x)	9300-06 til -08	0.1 %	0.02 %
Konjugat (50 x)	9300-09	0.1 %	/

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

- Stoppløsning 9300-05 (0,5 M K₃PO₄) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9300-06 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 < 12 % 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 9300-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af alveolær 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 multilocularis*** Em2-Em18 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 multilocularis*** Em2-Em18 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 83% blev fundet hos 151 sera patienter der lider af alveolær echinokokose. En specificitet på 98% blev fundet hos 267 sera fra 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)	0.647	1.518	0.580	1.407
Standardafvigelse (absorbans)	0.033	0.058	0.026	0.064
Variationskoefficient (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Begrænsninger:

En specificitet på 84% blev fundet med 63 sera af patienter, der lider af cystisk echinokokose. En specificitet på 93% blev fundet hos 46 sera patienter med andre parasitære infektioner. Krydsreaktivitet forekommer hovedsageligt hos patienter med trichinellose, fascioliasis 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:

- Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. **36** : 151-160.
- 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.
- Eckert, J., Conraths, F. and Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int. J. Parasitol. **30** : 1283-1294.
- Müller, N., Frei, E., Nuñez, S. and Gottstein, B. (2006) Improved serodiagnosis of alveolar echinococcosis of humans using an in vitro-produced *Echinococcus multilocularis* antigen. Parasitology. **134** : 1-10.
- Knapp, J., Sako, Y., Grenouillet, F., Bresson-Hadni, S., Richou, C., Gbaguidi-Haore, H., Ito, A., Millon, L. (2014) Comparison of the serological tests ICT and ELISA for the diagnosis of alveolar echinococcosis in France. Parasite. **21**.



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

