

Echinococcus multilocularis (Em2-Em18) IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för diagnos av mänskliga alveolär echinokockos

96 analyser på enskilda brunnar för in vitro diagnostisk användning och för professionell laboratorieanvändning



Instruktioner för användning av artikel N° 9300
UDI-DI: 07640158219300



Avsedd användning:

Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em2-Em18) IgG ELISA kitet är avsedd för kvalitativ upptäckt av IgG antikroppar mot *Echinococcus multilocularis* i humant serum. Sereologi är ett hjälpmedel mot diagnoser och kan användas som ensam metod för diagnos.

Bakgrund:

Alveolär echinokockos orsakas av larvstadiet av *Echinococcus multilocularis*, en bandmask som finns i råvar, prärievarg, hundar och några andra husdjur. Människor kan smittas av oavsiktligt intag av lungmaskägg på förorenad mat eller vatten. Larvformerna av *E. multilocularis* mognar inte fullt ut i gödselcystor hos människor, men kontinuerlig proliferation av blåsor som invaderar och förstör omgivande vävnader, kommer på ett tumörliknande sätt att orsaka leverdysfunktion. Parasiten kan sprida sig i andra organ så som lungor och hjärna. De huvudsakliga symptomen är buksmärta, asteni, hepatomegali och gulsot. Diagnosen är baserad på bildteknik som CT-skanningar för att visuellt detektera parasitmassor och respektive diffusa cystliknande strukturer. Serologiska tester används för screening av populationer i riskzonen och för uppföljande AE-patienter efter behandling.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på ömtåliga mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 antigener. Specifika antikroppar i testet kommer att binda dessa antigener och tvättning kommer ta bort ospecifika antikroppar. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Ett andra tvättsteg kommer att avlägsna obundet konjugat. Återgivning av bundna antikroppar görs genom tillsats av pNPP-substrat som blir gult i närvaro av alkaliskt fosfatas. Färgintensiteten är proportionell mot mängden av *Echinococcus multilocularis* specifika antikroppar i provet. Kaliumfosfat tillsättes för att stoppa reaktionen. Absorbans vid 405 nm läses med användning av en ELISA-mikroplatta läsare.

Testet är manuellt men kan utföras med automatiska system, vilket måste valideras av användaren.

Material som ingår i kitet (96 provningar):

WELL	9300-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18 antigener	96	brunnar
DILB	9300-02	Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila	50	ml
WASH	9300-03	Tvättlösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9300-04	Enzymlösning	50	ml
STOP	9300-05	Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock	200	µl
CONTROL -/+	9300-07	Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock	200	µl
CONTROL +	9300-08	Positivt kontrollserum (20 x), rött lock	200	µl
CONJ	9300-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock	300	µl
SUBS	9300-10	Fosfatas substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram för ELISA 8-brunnhållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten mellan +2°C och +8°C (transport validerad mellan -20°C och +37°C i 21 dagar). Undvik långvarig exponering av komponenterna för direkt ljus. Utgångsdatumet och partinumret av kitet anges på sidan av lådan. Efter första öppningen är alla reagens stabila till och med utgångsdatumet när de lagras mellan +2°C och +8°C.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för spädnings av sera. Limtejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på +37°C. ELISA läsare inställd på 405 Nm. Manuell eller automatisk utrustning för sköljning av brunnar. Vortex-blandare. Timer.

Preparationer av reagens innan användning:

Låt alla reagenser värmas mellan +20°C och +30°C i minst 1 timme och blanda före användning.

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9300-01 och ta bort antal brunnar som behövs (en för blank, tre för kontroller, plus antal prov). 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.

Spädningsbuffert: utspädd spädningsbuffert (10 x) koncentrat 9300-02, 1/10 i destillerat vatten. Detta används för utspädning av kontroller, prover och konjugat. Den utspädda bufferten är stabil i 2 månader mellan +2°C och +8°C.

Tvättlösning: utspädd tvättlösning (10 x) koncentrat 9300-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvättlösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas. Den utspädda tvättlösningen är stabil i 2 månader mellan +2°C och +8°C.

Kontrollsera: utspädd 10 µl kontrollsera 9300-06 till -08 i 190 µl spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/20). Det utspädda kontrollsera är stabilt i 2 månader mellan +2°C och +8°C.

Konjugat: utspädd konjugat 9300-09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: upplös tabletter av fosfatas substrat 9300-10 i utspädd buffert 9300-04 (1 tablett i 2,5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tabletten/erna. Späd substratet på analysdagen och skydda röret från direkt ljus. Tabletter och substratlösningar borde vara färglösa, eller bara ha en ljusgul skiftning. Om en tablett eller en substratlösning blir gul kan den ha delvis hydrolyserats och bör kasseras. Förvara inte substratlösningen.

Stopplösning: använd reagens 9300-05 utspädd.

Provtagning och förberedning

Använd humant-serum. Serum bör förvaras mellan +2°C och +8°C om testet utförs inom 7 dagar, annars lagras vid -20°C eller lägre. Undvik upprepade frysning och upptining.

Vortexprover och späd 1/201 i spädningsbuffertlösning (t.ex. 5 µl prov i 1,0 ml). Förvara inte det utspädda provet.

Varningar och säkerhetsåtgärder:

Giftiga föreningar finns i följande koncentration:

Komponent	Referens	Natriumazid (N_3N_3)	Mertiolat
Spädningsbuffert (10 x)	9300-02	0,1%	0,02%
Tvättlösning (10 x)	9300-03	0,05%	/
Enzymlösning	9300-04	0,01%	/
Kontrollsera (20 x)	9300-06 till -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9300-09	0,1%	/

Vid de använda koncentrationerna har natriumazid och merthiolat ingen toxikologisk risk vid kontakt med hud och slemhinnor.

Komponent	Farlig komponent	Piktogram för fara	Faroangivelse	Försiktighetsåtgärd
Stopplösning	kaliumfosfat, trebasiskt		Orsakar allvarliga ögonskador	Använd ögonskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (9300-06 till -08) är av animaliskt ursprung (kaniner) och måste hanteras med försiktighet.
- Behandla alla reagens och prov som potentiellt infektiöst material.
- Byt inte reagenser av olika partier eller Bordier ELISA-kit.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagens i denna utrustning.
- Använd inte reagens efter dess utgångsdatum.
- Stäng reagensflaskorna tätt omedelbart efter användning, och byt inte ut skruvlock för att undvika förorening.
- Använd separata och rena pipetter-tips för varje prov.
- Återanvänd inte mikrobrunnar.
- Undvik försämring av mikrobrunnarna genom mekanisk verkan (spetsar/koner, munstycken).
- Beskrivningarna av symboler som används på etiketterna finns på webbplatsen www.bordier.ch.

Avfallshantering:

Alla material som används för detta test anses allmänt som farligt avfall. Se nationella och regionala lagar och förordningar för bortskaffande av farligt avfall.

Procedur:

Vid körning av analysen, undvik bildandet av bubblor i brunnarna.

Steg 1: Förinkubation:

Fyll brunnarna med 250 µl spädningsbuffertlösning.

Inkubera i 5 till 15 minuter mellan +20°C och +30°C.

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

Steg 2: Inkubation med prover:

Fyll den första brunnen i remsan med 100 µl spädningsbuffert (inget serumblankt).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med respektive 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontrollsera. För analyser av mer än 25 prover rekommenderar vi att fylla de tre sista brunnarna med kontrollsera som ett duplikat.

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

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid +37°C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 3: Inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn (inklusive det inget serumblankt).

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid +37°C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 4: Inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid +37°C.

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

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Om det behövs, torka botten av brunnarna och eliminera bubblor. Mät absorbanserna vid 405 Nm inom 1 timme efter tillsatsen av stopplösning.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serumblankt från alla mätvärden. Beräkna de genomsnittliga absorbansvärdena för duplicerade serumkontroller när det är tillämpligt. Testet är giltigt om dem påföljande kriterierna uppfylls:

- absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200
- A av svagt positiv kontroll > 14% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 6% av A av positiv kontroll
- A av inget serumblankt < 0,350

Om provet ger en signal som överskrider mikroplattläsarens mätområde, bör värdet som motsvarar läsarens övre mätområde tillskrivas.

Kvalitetskontroll av nuvarande partier publiceras på vår hemsida: www.bordier.ch.

Antikroppskoncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9300-07 har ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av alveolär echinokockos och friska humana sera. Det skilda index av ett prov definieras efter subtraktion av det inget serumblankt ämne som:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbans prov}}{\text{Absorbans avskilt serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **1,0**. I detta fall, IgG antikroppskoncentrationen mot *Echinococcus multilocularis* antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när indexet av det analyserade provet är större än eller lika med **1,0**. I detta fall, IgG antikroppskoncentrationen mot *Echinococcus multilocularis* antigener är kliniskt icke signifikant. Det indikerar att patienten har haft kontakt med parasiten.

En gräzon kan definieras av varje laboratorium enligt patientpopulationen. Vid gränsöverskridande eller tvivelaktiga resultat rekommenderar vi att du upprepar testet igen 2-4 veckor senare med ett nytt prov.

Vid positivt eller tveksamt resultat rekommenderar vi att du utför ett bekräftelsetest (oftast med western blot) om ett sådant test är tillgängligt eller krävs enligt nationella bestämmelser.

Analytiska prestationer:

Analytisk specificitet:

En specificitet på 84% fann man i 63 sera från patienter med cystisk echinokockos. En specificitet på 93% fann man i 46 sera från patienter med andra parasitinfektioner. Korsreaktivitet uppträder huvudsakligen hos patienter med trikinos, fascioliasis och cysticerkos.

Ingen positiv eller negativ interferens sågs när sera tillsatts suprafysiologiska koncentrationer av hemoglobin, lipider eller bilirubin.

Noggrannhet:

Repeaterbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i duplikat på 10 olika analyser.

	Repeaterbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0,580	1,407	0,647	1,518
Standardavvikelse (absorbans)	0,026	0,064	0,034	0,069
Variationskoefficient (%)	4,5	4,6	5,3	4,5

Kliniska prestationer:

Diagnostisk känslighet:

En sensitivitet på 83% fann man i 151 sera från patienter med alveolär echinokockos.

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 98% fann man i 114 sera från blodgivare (schweiziska), 100 sera från patienter på en infektionsenhet (schweizisk) ooh 52 sera från patienter med misstänkt alveolär echinokockos, men där denna sjukdom med säkerhet hade uteslutits

Positivt och negativt prediktivt värde:

Man fann ett PPV på 95% och ett NPV på 91% i ovannämnda populationer.

Förväntade värden i normala och drabbade populationer:

I en normalpopulation bestående av 114 schweiziska blodgivare, i 100 sera från en schweizisk infektionsenhet ooh 52 sera från patienter med misstänkt alveolär echinokockos, men där sjukdomen med säkerhet hade uteslutits är det förväntade indexvärdet 0,19. I en infekterad population med 151 sera från patienter med alveolär echinokockos är det förväntade indexvärdet 2,76.

Incidenter:

Varje allvarlig incident som inträffar i samband med produkten ska anmälas till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.

Begränsningar:

Diagnos av en infektionssjukdom bör inte upprättas på grundval av ett enda testresultat. En noggrann diagnos bör ta hänsyn till endemisk situation, klinisk historia, symptomatologi, bildbehandling och serologiska data. Hos immunförsvagade patienter och nyfödda är serologiska data av begränsat värde.

Referenser:

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.

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 S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

