

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Enzýmový imunotest na sérologické sledovanie ľudskej alveolárnej echinokokózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre artikel č. **9310**
Reg. zn. CE: CH-201708-0010 - UDI-DI: 07640158219317



Plánované použitie:

Súprava Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti Em-18 antigénu *Echinococcus multilocularis* v ľudskom sére. Tento test je určený na pooperačné a / alebo post-terapeutické sledovanie infikovaných pacientov.

Pozadie:

Alveolárna echinokokóza je spôsobená larválnym štádiom *Echinococcus multilocularis*, pásomnica nachádzajúcim sa v líškach, kojotoch, psoch a niektorých iných psových zvieratách. Ľudia môžu byť infikovaní náhodným požitím pásomnicových vajec na kontaminovaných potravinách alebo vode. Larválne formy *E. multilocularis* nie sú úplne nevyspejú úplne do fertílých cyst u ľudí, ale nepretržitá proliferácia vezikúl, ktoré napadajú a ničia okolité tkanivá, spôsobí nádorovým spôsobom disfunkciu pečene. Parazit sa môže rozšíriť do iných orgánov, ako sú pľúca a mozog. Hlavnými príznakmi sú bolesť brucha, asténia, hepatomegália a žltáčka. Diagnóza je založená na zobrazovacích technikách, ako sú CT vyšetrenia na vizuálne detekovanie parazitárnych hmôt a príslušných difúzných cystovitých štruktúr. Sérologické testy sa používajú na skrining rizikových populácií a následných pacientov s AE po liečbe.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitivovaných rekombinantným antigénom Em-18 *Echinococcus multilocularis*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalického fosfatázy. Druhý premývací krok odstráni nenaštieňovaný konjugát. Odhalenie nenaštieňovaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalického fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Echinococcus multilocularis* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodôštičiek ELISA. Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9310-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi rekombinantným Em-18 <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	jamky
DILB	9310-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
WASH	9310-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9310-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
CONTROL -/+	9310-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
CONTROL +	9310-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
CONJ	9310-09	Proteín A - konjugát alkalického fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
SUBS	9310-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8°C (preprava pri teplote okolia), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9310-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitivované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9310-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9310-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickéj fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Kontrolné séra: rozriedte 10 µl kontrolných sér 9310-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Konjugát: rozriedte konjugát 9310-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

Roztok substrátu: rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9310-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9310-04 (1 tableta v 2,5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

Zastavovací roztok: použite reagent 9310-05, nezriedený.

Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladuje pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN ₃)	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9310-02	0,1%	0,02%
Premývací roztok (10 x)	9310-03	0,05%	/
Premývací roztok	9310-04	0,01%	/
Kontrolné séra (20 x)	9310-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9310-09	0,1%	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 9310-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9310-06 až -08) sú z králikov.
- Zaochádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.
- Zabráňte znehodnoteniu mikrojamek mechanickým pôsobením (špičky/kužele, dýzy).
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke www.bordier.ch.

Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorky bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabej pozitívnej kontrolnej vzorky > 3% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 3% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: www.bordier.ch.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9310-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov alveolárnej echinokokózy a zdravým ľudským sérom. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom *Echinococcus multilocularis* klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom *Echinococcus multilocularis* považovaná za klinicky významnú. Pokles alebo negatívny výsledok anti-recEm 18 protilátok v sére poukazuje na kompletne chirurgické odstránenie lézie spôsobenej parazitom, alebo deaktiváciu parazita medikamentóznou liečbou.

V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať potvrdzovací test (najčastejšie western blot), ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštátnymi predpismi.

Analytické výkony:

Analytická špecifickosť:

Presnosť s výškou 100 % sa zistila v 12 sérach pacientov s inými parazitárnymi infekciami (6-krát cystická echinokokóza, -3-krát nediferencovaná echinokokóza a 3-krát alternatívne diagnózy).

Pri suprafyziologických koncentráciách hemoglobínu, lipidov alebo bilirubínu v sérach doplnených interferentmi sa nepozorovala žiadna pozitívna ani negatívna interferencia.

Precíznosť:

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.
Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0,186	1,260	0,157	1,123
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0,022	0,072	0,016	0,074
Variačný koeficient (%)	11,8	5,7	10,0	6,5

Tieto výkony nemožno hodnotiť, pretože pre túto analýzu neexistuje certifikovaný referenčný materiál:

- analytická citlivosť (limity detekcie a kvantifikácie),
- presnosť,
- pravdivosť,
- rozsah merania,
- linearita.

Klinické výkony:

Diagnostická citlivosť:

Vzorky séra sa skúmali pred operáciou a po operácii 12 pacientov s potvrdenou alveolárnou echinokokózou, ktorí podstúpili radikálny alebo neradikálny operačný zákrok. Pred operáciou malo 9 pacientov (75 %) index >1. Z týchto pacientov malo po operácii 5 pacientov negatívne výsledky. U všetkých 12 pacientov však hladiny protilátok Em18 po operačnom zákroku klesli a boli výrazne nižšie ako vo vzorkách pred operačným zákrokom.

Skúmali sa vzorky séra 25 pacientov s potvrdenou alveolárnou echinokokózou bez chirurgického zákroku, ale so stabilným ochorením pod antiparazitárnou chemoterapiou. Z nich 18 (72 %) malo index >1 (medián indexu 6,3). Skúmali sa vzorky séra 7 pacientov s potvrdenou alveolárnou echinokokózou bez chirurgického zákroku, ale s progresívnym ochorením pod antiparazitárnou chemoterapiou. Z nich 6 (86 %) malo index >1 (medián indexu 13,8).

Diagnostická špecifickosť:

Presnosť s výškou 98 % sa zistila v 99 sérach darcov krvi (švajčiarskych). Presnosť s výškou 94 % sa zistila v 100 sérach pacientov infekčného oddelenia (Švajčiarsko).

Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota:

Pri vyššie uvedených populáciách sa zistila PPV 80% a NPV 96%.

Očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie:

V normálnej populácii 99 švajčiarskych darcov krvi a 100 sér zo švajčiarskeho infekčného oddelenia je očakávaná hodnota indexu 0,33. Údaje o očakávanej hodnote indexu v postihnutej populácii neboli k dispozícii.

Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

Obmedzenia:

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje. U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

Odkazy na použitú literatúru:

- Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y. Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., et al. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80** : 792-7.
- Ishikawa, Y., Sako, Y. Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., et al. (2009) Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multiorgan involvement by use of recombinant Em18. *J. Clin. Microbiol.* **47** : 3191-6.
- Tappe, D., Sako, Y., Itoh, S., Frosch, M., Gruner, B., Kern, P., Ito, A. (2010) Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stage. *Clin Vaccine Immunol.* **17** : 944-8.
- Ammann, R.W., Stumpe, K.D.M., Grimm, F. Deplazes, P., Huber, S., Bertogg, K., et al. (2015) Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-Em18/3-10 serology. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**.
- Sulima, M., Szostakowska, B., Nahorsk, W., Sikorrská, K., Wolyniec, W. and Waz, P. (2019) The usefulness of commercially available serological tests in the diagnosis and monitoring of treatment in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Hep.* **5** : 327-333.
- Hotz, J.F., Peter, L., Kapp-Schworer, S., Theis, F., Eberhardt, N., Essig, A. et al. (2022) Evaluation of Serological Markers in Alveolar Echinococcosis Emphasizing the Correlation of PET-CTI Tracer Uptake with RecEm18 and Echinococcus-Specific IgG. *Pathogens* 11020239.



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

