

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

recEm-18

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus alveolių echinokokozės serologiniam stebėjimui

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 9310
EC reg. N°: CH-201708-0010



Naudojimo paskirtis:

Bordier Echinococcus multilocularis ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš *Echinococcus multilocularis* Em-18 žmogaus kraujo serume nustatymui. Šis testas skirtas infekuotų pacientų pooperaciniam ir (arba) po terapiniam stebėjimui.

Kilmė:

Alveolių echinokokozę sukelia lervinės stadijos *Echinococcus multilocularis*, kaspinuotis esantis lapėse, kojotuose, šunyse ir kai kuriuose šunų šeimos žinduoliuose. Žmonės gali užsikrėsti atsitiktinai nuriję kaspinuočio kiaušinėlius per užterštą maistą ar vandenį. Lervinės *E. multilocularis* formos visiškai nesubręsta žmogaus cistose, bet nuolatinis pūslelių plitimas, kurios plečiasi ir naikina aplinkinius audinius, sukelia kepenų disfunkciją (panašus į naviką). Parazitas gali plisti į kitus organus, tokius kaip plaučiai ir smegenys. Pagrindiniai simptomai: pilvo skausmas, astenija, hepatomegalija ir gelta. Diagnozė nustatoma remiantis vaizdinėmis technologijomis, tokiomis kaip kompiuterinė tomografija, kad būtų galima vizualiai aptikti parazitines mases ir atitinkamas difuzines cistines struktūras. Serologiniai tyrimai naudojami rizikos grupių stebėjimui ir tolesniam AE pacientų po gydymo tyrimui.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) laukuose mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Echinococcus multilocularis* Em-18 antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie tų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintas konjugatas. Surenkami antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Echinococcus multilocularis* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9310-01	Laukimos ELISA juostelės su <i>Echinococcus multilocularis</i> Em-18 antigenais	96	ulinėliai
DILB	9310-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9310-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9310-05	Stabdomasis tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9310-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9310-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9310-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9310-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutėsono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilus iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruoimas prieš naudojimą:

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio mai elio 9310-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruo tus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, uždėdyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9310-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9310-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9310-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 9310-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9310-10 neskiestame fermento buferyje 9310-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9310-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruoimas:

Naudoti ūmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomas 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar ūemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N _a N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9310-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	9310-03	0,05 %	/
Fermento buferis	9310-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9310-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	9310-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9310-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9310-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Blokavimas:

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną ulinėį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 5 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prieš orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: www.bordier.ch.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9310-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo alveolių echinokokozės ir sveiko žmogaus arba pagal remisiją serumų.

Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Echinococcus multilocularis* Em-18 antigenus yra klinikiškai nereikšminga. Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Echinococcus multilocularis* Em-18 antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Anti-recEm18 serumo antikūno lygių sumažėjimas ar nebuvimas rodo visišką chirurginį parazitų sunaikinimą arba neaktyvumą, gydymo vaistais metu.

Jautrumas ir specifiškumas:

Buvo ištirtos priešoperaciniai ir pooperaciniai 12 pacientų, kuriems buvo patvirtinta alveolinė echinokokozė ir kurie turėjo radikalią ar neradikalią chirurginę operaciją, serumo mėginių poras. Prieš operaciją, 9 pacientai (75%) turėjo indeksą >1. Tarp šių pacientų, 5 turėjo neigiamus priešoperacinius rezultatus. Tačiau 12 pooperacinių pacientų Em-18 antikūno lygiai nukrito ir buvo žymiai žemesni nei priešoperacinių mėginių.

Buvo tirti 25 pacientų serumų mėginiai su patvirtinta stabilia alveolių echinokokoze be operacijos, taikant antiparazitinę chemoterapiją. 18 (72%) iš jų turėjo indeksą >1 (vidutinis indeksas 6,3).

Buvo tirti 7 pacientų serumų mėginiai su patvirtinta progresuojančia alveolių echinokokoze be operacijos, taikant antiparazitinę chemoterapiją. 6 (86%) iš jų turėjo indeksą >1 (vidutinis indeksas 13,8).

Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipemini ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	0.186	1.260	0.157	1.123
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0.022	0.072	0.016	0.074
Pokyčio koeficientas (%)	11.8	5.7	10.0	6.5

Apribojimai:

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

Literatūros altiniai:

Ammann, R.W., Rebber, E.C., Gottstein, B., Grimm, F., Eckert, J., Renner, E.L. (2004) Immunosurveillance of alveolar echinococcosis by specific humoral and cellular immune tests: long-term analysis of the Swiss chemotherapy trial (1976-2001). *J. Hepatol.* **41** : 551-9.

Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y., Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., Nakao, M., Ito, A., Kern, P. (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., Ohsaki, Y., Miyokawa, N., Nakao, M., Nakaya, K., Ito, A. (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**.



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

