

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus alveolių echinokozės serologiniam stebėjimui

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



Naudojimo instrukcija produktui N° 9310
EC reg. N°: CH-201708-0010 - UDI-DI: 07640158219317



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prie *Echinococcus multilocularis* Em18 žmogaus kraujo serume nustatymui. Šis testas skirtas infekuotų pacientų pooperaciniam ir (arba) po terapiniam stebėjimui.

Kilmė:

Alveolių echinokozę sukelia lervinės stadijos *Echinococcus multilocularis*, kaspinuotis esantis lapėse, kojotuose, šunyse ir kai kuriuose šunų šeimos žinduoliuose. Žmonės gali užsikrėsti atsitiktinai nuriję kaspinuotio kiaušinėlius per užterštą maistą ar vandenį. Lervinės *E. multilocularis* formos visiškai nesubręsta žmogaus cistose, bet nuolatinis pūselių 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) laisvose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Echinococcus multilocularis* Em18 rekombinantiniu antigenu, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėdant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Echinococcus multilocularis* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija 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	Laisvos ELISA juostelės su <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinantiniu antigenu	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	Stabdomas 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
		Rėmelis - ELISA 8- šulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine vieta. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės ono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs 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 sklavimo įranga. Sūkurinis maiytuvai. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir ištirti maišomi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maišelio elio 9310-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į dėmelį teisinga kryptimi. Ištirti 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). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti iš dalies hidrolizuotas, todėl reikia išmesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9310-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai. Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Išspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiški junginiai atsiranda naudojant šią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₃ 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 triušų.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galima infekcinę medžiagą.
- Nemašyti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su šio rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užteršimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje www.bordier.ch.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis šalies 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 iš siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (mėginį be serumo).

Į kitus tris iš 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 stabdymo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę išvisų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 3% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 3% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 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 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* antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

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

Jeigu rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

Analitiniai pasirodymai:

Analitinis specifiškumas:

100% specifiškumas nustatytas 12 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis (6 cistine echinokokoze, 3 nediferencijuota echinokokoze ir 3 alternatyviomis diagnozėmis), serumuose.

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

Tikslumas:

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

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbicija)	0,186	1,260	0,157	1,123
Standartinis nuokrypis (absorbicijos)	0,022	0,072	0,016	0,074
Pokyčio koeficientas (%)	11,8	5,7	10,0	6,5

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijškumas

Klinikiniai pasirodymai:**Diagnostinis jautrumas:**

Buvo tiriami 12 pacientų, kuriems buvo patvirtinta alveolinė echinokokoze ir kuriems buvo atlikta radikali ar neradikali operacija, susieti serumo mėginiai prieš ir po chirurginio gydymo. Prieš operaciją 9 pacientams (75%) indeksas buvo >1. Iš šių pacientų 5 pooperaciniai rezultatai buvo neigiami. Tačiau visuose 12 pacientų Em18 antikūnų lygis po operacijos sumažėjo ir buvo žymiai mažesnis nei mėginiuose prieš operaciją.

Buvo tiriami 25 pacientų, kuriems buvo patvirtinta alveolinė echinokokoze be operacijos, tačiau kurių liga stabili, taikant antiparazitinę chemoterapiją, serumo mėginiai. 18 (72%) iš jų indeksas >1 (indekso mediana 6,3). Iširti 7 pacientų, kuriems patvirtinta alveolinė echinokokoze be operacijos, bet kurių liga progresuoja, taikant antiparazitinę chemoterapiją, serumo mėginiai. 6 (86%) iš jų indeksas >1 (indekso mediana 13,8).

Diagnostikos specifiškumas:

99 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 98% specifiškumas. 94% specifiškumas buvo nustatytas naudojant 100 gydymo įstaigos infekcijų skyriaus pacientų serumus (Šveicarija).

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 80% PPV ir 96% NPV.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 99 Šveicarijos kraujo donorai ir 100 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,33. Duomenų apie numatomą Indekso vertę paveiktoje populiacijoje nebuvo.

Incidentai:

Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

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 šaltiniai:

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., Sikorriska, 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* **11**:20239.



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

