

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

recEm-18

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til serologiske opfølgning af human alveolær echinokokose

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

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9310
EC reg. N°: CH-201708-0010



Tilsigtet anvendelse:

Bordier Echinococcus multilocularis ELISA kit er beregnet til kvantitativ påvisning af IgG antistoffer mod Em-18 antigen af *Echinococcus multilocularis* i humant serum. Denne test er beregnet til postoperativ og / eller post-terapeutisk opfølgning af inficerede patienter.

Baggrund:

Alveolar echinococcosis er forårsaget af larve stadiet af *Echinococcus multilocularis*, en bænelorm 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 kontinuerlig proliferation 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 gulsot. 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*** Em-18 rekombinant antigen. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af mykosespecifikke 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 phosphatase. 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	9310-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em-18 rekombinant antigen	96	brønde	
DILB	9310-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml	
WASH	9310-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml	
ENZB	9310-04	Enzym buffer	50	ml	
STOP	9310-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml	
CONTROL	-	9310-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL	-/+	9310-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL	+	9310-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ		9310-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl
SUBS		9310-10	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 9310-01, 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 9310-02, 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 9310-03, 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 9310-06 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 9310-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9310-10 i ufortyndet enzym buffer 9310-04 (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 9310-05 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)	9310-02	0.1 %	0.02 %
Vaskeopløsning (10 x)	9310-03	0.05 %	/
Enzymbuffer	9310-04	0.01 %	/
Kontrolsera (20 x)	9310-06 til -08	0.1 %	0.02 %
Konjugat (50 x)	9310-09	0.1 %	/

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

- Stoppløsning 9310-05 (0,5 M K₃PO₄) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9310-06 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 < 5 % 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 9310-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af alveolær echinokokose og sunde eller under remission 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* Em-18 rekombinant antigen 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* Em-18 rekombinant antigen at være klinisk signifikant. Eller negativation af anti-recEm18 serumantistofniveauer indikerer en fuldstændig kirurgisk resektion af parasitlæsionen eller en inaktivering af parasitten ved lægemiddelbehandlin

Analysens sensitivitet og specificitet:

Parrede præ- og postkirurgiske serumprøver af 12 patienter med bekræftet alveolær echinokokose og har haft en radikal eller ikke-radikal operation blev undersøgt. Før-kirurgisk havde 9 patienter (75%) et indeks > 1. Blandt disse patienter havde 5 negative postkirurgiske resultater. Men for alle 12 patienter faldt post-kirurgisk Em18-antistofniveauer og var signifikant lavere end i prækirurgiske prøver.

Serumprøver af 25 patienter med bekræftet alveolær echinokokose uden kirurgi men med stabil sygdom under antiparasitisk kemoterapi blev undersøgt. 18 (72%) af dem havde et indeks > 1 (medianindeks 6.3).

Serumprøver af 7 patienter med bekræftet alveolær echinokokose uden kirurgi men med progressiv sygdom under antiparasitisk kemoterapi blev undersøgt. 6 (86%) af dem havde et indeks > 1 (medianindeks 13,8).

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)	0.186	1.260	0.157	1.123
Standardafvigelse (absorbans)	0.022	0.072	0.016	0.074
Variationskoefficient (%)	11.8	5.7	10.0	6.5

Begrænsninger:

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:

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

