

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

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
UDI-DI: 07640158219317



Tilsigtet anvendelse:

Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA kit er beregnet til kvalitativ påvisning af IgG antistoffer mod Em18 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 bændelorm 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 tumorigen 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* Em18 rekombinant antigener. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Aflæsning 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 er manuel, men kan udføres med automatiske systemer, som skal valideres af brugeren.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9310-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinant antigener	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 mellem +2°C og +8°C (transport valideret mellem -20°C og +37°C i 21 dage), 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 mellem +2°C og +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:

Bring alle reagenser til en temperatur på mellem +20°C og +30°C i mindst 1 time, og bland dem før 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 mellem +2°C og +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 mellem +2°C og +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 mellem +2°C og +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. Opbevares mellem +2°C og +8°C, hvis analysen foretages inden for 7 dage, 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). Opbevar ikke den fortyndede prøve.

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.

Komponent	Farlig komponent	Fare-piktogram	Faresætning	Forsigtighedserklæring
Stopløsning	kaliumfosfat, trebasisk		Forårsager alvorlige øjenskader	Bær øjenbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9310-06 til -08) er af animalsk oprindelse (kaniner) og skal håndteres med forsigtighed.
- 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 udløbsdato.
- 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.
- Undgå forringelse af mikrobrønde ved mekanisk påvirkning (spidser/kegler, dyser).
- Beskrivelser af de anvendte symboler på etiketterne kan findes på hjemmesiden www.bordier.ch.

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: Præinkubation:

Fyld brøndene med 250 µl fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter mellem +20°C og +30°C.

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 (ikke-serumblank).

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 stopløsning 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 ikke-serumblank 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 med svag positiv kontrol > 3% af A med positiv kontrol
- A af negativ kontrol < 3% af A af positiv kontrol
- A af ikke-serumblank < 0,350

Hvis prøven leverer et signal, der overskrider mikropladelæserens måleområde, skal den værdi, der svarer til læserens øvre måleområde, tilskrives.

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 alveolar echinococcosis og sunde, humane sera. Afsnitets afskårede indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serumblank 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* antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når Indeks af den analyserede prøve er højere eller lig med **1,0**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod *Echinococcus multilocularis* antigener at være klinisk signifikant.

Eller negativation af anti-recEm18 serumantistofniveauer indikerer en fuldstændig kirurgisk resektion af parasitlæsionen eller en inaktivering af parasitten ved lægemiddelbehandling.

I tilfælde af et positivt eller tvivlsomt resultat, anbefaler vi at udføre en bekræftelsestest (oftest med western blotting), hvis en sådan test er tilgængelig eller kræves i henhold til nationale bestemmelser.

Analytisk ydeevne:

Analytisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 100 % med 12 sera fra patienter med andre parasitære infektioner (6 cystisk echinokokose, 3 udifferentieret echinokokose og 3 alternative diagnoser).

Der blev ikke observeret nogen positiv eller negativ interferens med suprafysiologiske koncentrationer af hæmoglobin, lipider eller bilirubin i sera suppleret med interferenter.

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 to eksemplarer 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	0,076
Variationskoefficient (%)	11,8	5,7	10,5	6,8

Kliniske præstationer:

Diagnostisk følsomhed:

Parrede præ- og postoperative serumprøver fra 12 patienter med bekræftet alveolar echinokokose, som havde gennemgået en radikal eller ikke-radikal operation, blev undersøgt. Prækirurgisk havde 9 patienter (75 %) et indeks >1. Blandt disse patienter havde 5 negative postoperative resultater. Men hos alle 12 patienter faldt Em18-antistofniveauerne efter operationen og var signifikant lavere end i de prækirurgiske prøver.

Serumprøver fra 25 patienter med bekræftet alveolar echinokokose uden kirurgi, men med stabil sygdom under antiparasitær kemoterapi. 18 (72 %) af dem havde et indeks >1 (medianindeks 6,3). Serumprøver fra 7 patienter med bekræftet alveolar echinokokose uden kirurgi, men med progressiv sygdom under antiparasitær kemoterapi. 6 (86 %) af dem havde et indeks >1 (medianindeks 13,8).

Diagnostisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 98 % med 99 sera fra bloddonorer (schweiziske). Der blev fundet en specificitet på 94 % med 100 sera fra patienter fra en infektiologisk enhed (schweizisk).

Positiv og negativ prædiktiv værdi:

Der blev fundet en PPV på 80% og en NPV på 96% hos de ovenfor nævnte populationer.

Forventede værdier i normale og berørte populationer:

I en normal population på 99 schweiziske bloddonorer og 100 sera fra en schweizisk infektiologisk enhed er den forventede indekxsværdi 0,33. Der forelå ingen data om den forventede indekxsværdi i en berørt population.

Hændelser:

Enhver alvorlig hændelse, der indtræffer i forbindelse med udstyret, skal meddeles fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

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:

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., Sikorska, 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**020239.



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

