

# Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Encimski imunski test za serološko spremljanje alveolarne ehinokokoze pri ljudeh

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 9310  
Uredba ES št.: CH-201708-0010 - UDI-DI: 07640158219317



## Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA je namenjen kvantitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti antigenu Em18 *Echinococcus multilocularis* v človeškem serumu. Ta test je namenjen pooperativnemu spremljanju in/ali spremljanju okuženih bolnikov po končanem zdravljenju.

## Ozadje:

Alveolarno ehinokokozo povzroča ličinka *Echinococcus multilocularis*, trakulje, ki jo najdemo pri lisicah, kojotih, psih in nekaterih drugih kanidih. Človek se lahko okuži z nenamernim zaužitjem jajčec trakulje z okuženo hrano ali vodo. Ličinke *E. multilocularis* pri ljudeh ne dozori v celoti v oplodne ciste, vendar bo neprekinjeno širjenje veziklov, ki napadejo in uničijo okoliška tkiva, povzročilo na tumorju podoben način disfunkcijo jeter. Parazit se lahko razširi v druge organe, kot so pljuča in možgani. Glavni simptomi so bolečine v trebuhu, astenija, hepatomegalija in zlatenica. Diagnoza temelji na tehnikah slikanja, kot je CT skeniranje, za vizualno odkrivanje parazitskih mas in ustreznih difuznih cist podobnih struktur. Serološki testi se uporabljajo za presejanje ogroženih populacij in za spremljanje bolnikov z AE po zdravljenju.

## Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z *Echinococcus multilocularis* Em18 rekombinantni antigeni. Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost zajedavsko specifičnih protiteles se odkrije s konjugatom proteina A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Echinococcus multilocularis* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčita z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test se lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, vendar mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

## Material v kompletu (96 testov):

<b>WELL</b>	9310-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinantni antigeni	96	vdolbinic
<b>DILB</b>	9310-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
<b>WASH</b>	9310-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9310-04	Encimski pufer	50	ml
<b>STOP</b>	9310-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9310-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9310-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9310-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	µl
<b>CONJ</b>	9310-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	µl
<b>SUBS</b>	9310-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablet
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

## Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet hranite pri 2° do 8°C (transport pri sobni temperaturi), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete pri 2-8°C.

## Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in µl). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na 37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

## Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente segrejte na sobno temperaturo in jih pred uporabo premešajte.

**Vdolbinice ELISA:** odprite stran aluminijaste vrečke 9310-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 9310-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je pri 2-8°C stabilen 2 meseca.

**Raztopina za pranje:** razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 9310-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrom, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je pri 2-8°C stabilna 2 meseca.

**Kontrolni serumi:** razredčite 10 µl kontrolnega seruma 9310-06 do -08 v 190 µl raztopine pufra za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so pri 2-8°C stabilni 2 meseca.

**Konjugat:** razredčite konjugat 9310-09 v raztopini pufra za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

**Raztopina substrata:** raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 9310-10 v nerazredčenem encimskem pufru 9310-04 (1 tableta v 2,5 ml pufra). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtenek. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

**Raztopina za zaustavitev:** uporabite nerazredčen reagent 9310-05.

## Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti pri 2-8°C, če ga analiziramo v nekaj dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju.

Vzorci premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufra za redčenje (na primer 5 µl vzorca v 1,0 ml).

## Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolat
Pufer za redčenje	9310-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	9310-03	0,05%	/
Encimski pufer	9310-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9310-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9310-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

- Raztopina za zaustavitev 9310-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dražilna.
- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (9310-06 do -08) so pridobljeni iz kuncev.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjajte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjajte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

## Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

### 1. korak: Blokiranje:

Vdolbinice popolnoma napolnite z raztopino pufru za redčenje.

Inkubacija znaša 5 do 15 minut pri sobni temperaturi (blokiranje).

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

### 2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufru za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

### 3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

### 4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

### 5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

## Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 3% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 3% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov alveolarne ehinokokoze in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 9310-07. Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Echinococcus multilocularis (Em18)* klinično nepomembna.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Echinococcus multilocularis (Em18)* klinično pomembna.

Zmanjšanje ali negativna raven serumskih protiteles proti recEm18 kaže na popolno kirurško resekcijo zajedavske lezije ali inaktivacijo zajedavca z zdravljenjem z zdravili.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

## Analitične zmogljivosti:

### Analitična specifičnost:

Pri 12 serumih bolnikov z drugimi zajedavskimi okužbami (6 cističnih ehinokokoz, 3 nediferencirane ehinokokoze in 3 alternativne diagnoze) je bila ugotovljena 100-odstotna specifičnost testa.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopolnjenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

**Natančnost:**

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 10 vdolbinicah na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
<b>Povprečje (absorbanca)</b>	0,186	1,260	0,157	1,123
<b>Standardni odklon (absorbanca)</b>	0,022	0,072	0,016	0,074
<b>Koeficient variacije (%)</b>	11,8	5,7	10,0	6,5

Naslednjih zmogljivosti ni mogoče ovrednotiti, ker za to analizo ni certificiranega referenčnega materiala:

- Analitična občutljivost (meje zaznavnosti in kvantifikacije)
- Natančnost
- Resničnost
- Merilno območje
- Linearnost.

**Klinične zmogljivosti:****Diagnostična občutljivost:**

Preučeni so bili parni vzorci seruma pred in po posegu 12 bolnikov s potrjeno alveolarno ehinokokožo in po radikalnem ali neradikalnem posegu. Pred posegom je imelo 9 bolnikov (75 %) indeks >1. Med temi bolniki je imelo 5 negativne pooperativne rezultate. Toda pri vseh 12 bolnikih so pooperativne ravni protiteles Em18 padle in bile znatno nižje kot v vzorcih pred posegom.

Preučevali so se vzorci seruma 25 bolnikov s potrjeno alveolarno ehinokokožo brez posega, vendar s stabilno boleznijo v skladu z protizajedavsko kemoterapijo. 18 (72 %) jih je imelo indeks >1 (povprečni indeks 6,3). Preučevali so se vzorci seruma 7 bolnikov s potrjeno alveolarno ehinokokožo brez posega, vendar z napredujočo boleznijo v skladu z antizajedavsko kemoterapijo. 6 (86 %) jih je imelo indeks >1 (povprečni indeks 13,8).

**Diagnostična specifičnost:**

Pri 99 serumih (švicarskih) krvodajalcev je bila ugotovljena 98-odstotna specifičnost testa. Pri 100 serumih bolnikov iz (švicarske) enote za infektologijo je bila ugotovljena 94-odstotna specifičnost testa.

**Pozitivna in negativna napovedna vrednost:**

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 80% in NPV 96%.

**Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:**

Pri zdravi populaciji 99 švicarskih krvodajalcev in 100 serumov iz švicarske enote za infektologijo je pričakovana indeksna vrednost 0,33. Podatki o pričakovani indeksni vrednosti v prizadeti populaciji niso bili na voljo.

**Incidenti:**

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

**Omejitve:**

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslajenim imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

**Reference:**

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, Švica.  
Telefon: + 41 21 633 31 67, Faks: + 41 21 633 31 78, [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

