

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Imunoenzimski test za serološko praćenje humane alveolarne ehinokokoze

96 testova na pojedinačnim jamiicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Uputstvo za upotrebu za proizvod N° 9310
UDI-DI: 07640158219317



Predviđena upotreba:

Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA kit je namenjen za kvalitativnu detekciju IgG antitela na antigen Em18 parazita *Echinococcus multilocularis* u humanom serumu. Ovaj test je namenjen za postoperativno i/ili postterapijsko praćenje inficiranih pacijenata.

Pozadina:

Alveolarna ehinokokoza (AE) je uzrokovana larvalnim stadijumom *Echinococcus multilocularis*, pantljičare koja se javlja kod lisica, kojota, pasa i drugih kanida. Ljudi se mogu zaraziti slučajnim unošenjem jaja pantljičare putem kontaminirane hrane ili vode. Larve *E. multilocularis* ne sazrevaju u potpunosti u plodne ciste kod ljudi, ali će kontinuirana proliferacija vezikula koje invadiraju i uništavaju ga nalik tumoru prouzrokovati disfunkciju jetre. Parazit se može proširiti na druge organe, kao što su pluća i mozak. Glavni simptomi su bol u stomaku, astenija, hepatomegalija i žutica. Dijagnoza se zasniva na tehnikama vizuelizacije kao što su CT skeniranje za vizuelnu detekciju parazitskih masa i odgovarajućih difuznih struktura nalik cistama. Serološki testovi se koriste za skrining rizične populacije i za praćenje AE pacijenata nakon lečenja.

Princip i prezentacija:

Komplet obezbeđuje sav materijal potreban za izvođenje 96 imunoenzimskih testova (ELISA) na deljivim mikrotitracionim jamiicama senzibilisanim rekombinantnim antigenom Em18 parazita *Echinococcus multilocularis*. Specifična antitela u uzorku će se vezati za ove antigene, dok će se ispiranjem ukloniti nespecifična antitela. Prisustvo specifičnih antitela detektuje se konjugatom Proteina A i alkalne fosfataze. Drugim korakom ispiranja uklanjanju se nevezani konjugati. Detekcija vezanih antitela se postiže dodavanjem pNPP supstrata koji postaje žut u prisustvu alkalne fosfataze. Intenzitet boje je proporcionalan količini specifičnih antitela na *Echinococcus multilocularis* u uzorku. Kalijum fosfat se dodaje da bi se zaustavila reakcija. Apsorbancija na 405 nm se očitava pomoću ELISA čitača mikroploča.

Test je manuelan, ali se može izvesti sa automatskim sistemima, koji moraju biti validirani od strane korisnika.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	9310-01	Deljive ELISA trake senzibilisane rekombinantni antigen Em18 <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	udubljenja
DILB	9310-02	Pufer za razblaživanje, koncentrat (10 x), ljubičasto obojen	50	ml
WASH	9310-03	Rastvor za ispiranje, koncentrat (10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	9310-05	Rastvor za zaustavljanje reakcije (0.5M K3PO4)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Negativan kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	µl
CONTROL -/+	9310-07	Slabo pozitivan kontrolni serum (cut off, 20 x), žuti čep	200	µl
CONTROL +	9310-08	Pozitivan kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	µl
CONJ	9310-09	Konjugat Proteina A i alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	µl
SUBS	9310-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Rezervoar za Multipipette, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 ELISA udubljenja	1	komad

Rok upotrebe i čuvanje:

Čuvati komplet između +2 °C i +8 °C (potvrđen je transport između -20 °C i +37 °C 21 dan), izbegavati dugotrajno izlaganje komponenti direktnoj svetlosti. Datum isteka roka upotrebe i lot broj kompleta odštampani su na bočnoj strani kutije. Nakon prvog otvaranja, svi reagensi su stabilni do isteka roka upotrebe kada se čuvaju na temperaturi od +2 °C do +8 °C.

Oprema koja je potrebna, ali nije obezbeđena sa kompletom:

Pipete (ml i µl). Tikvice. Epruvete za razblaživanje. Adhezivna traka za pokrivanje jamiica tokom inkubacije. Destilovana voda. Inkubator postavljen na +37 °C. ELISA čitač postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jamiica. Vorteks mikser. Tajmer.

Priprema reagensa pre upotrebe:

Sve reagense zagrejte na temperaturi između +20°C i +30°C najmanje 1 sat i promešajte pre upotrebe.

ELISA jamiice: otvoriti stranu aluminijumske kesice 9310-01 i ukloniti broj potrebnih jamiica (jedno za slepu probu, tri za kontrole plus broj uzoraka). Senzibilizovane jamiice staviti u držač sa 8 jamiica. Ako je potrebno, popuniti prazne pozicije u držaču korišćenim jamiicama. Staviti držač(e) u okvir u pravilnoj orijentaciji. Zatvoriti otvoreno pakovanje sa kesicom desikanta.

Pufer za razblaživanje: razblažiti pufer za razblaživanje (10 x) koncentrat 9310-02, destilovanom vodom u odnosu 1/10. Koristi se za razblaživanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razblaženi pufer je stabilan 2 meseca na temperaturi između +2 °C i +8 °C.

Rastvor za ispiranje: razblažiti rastvor za ispiranje (10 x) koncentrat 9310-03, destilovanom vodom u odnosu 1/10. Izbegavati pufer koji sadrže fosfate jer mogu inhibirati enzimsku aktivnost alkalne fosfataze. Razblaženi rastvor za ispiranje je stabilan 2 meseca na temperaturi između +2 °C i +8 °C.

Kontrolni serumi: razblažiti 10 µl kontrolne serume 9310-06 do -08 u 190 µl rastvora pufera za razblaživanje (konačno razblaženje 1/20). Razblaženi kontrolni serumi su stabilni 2 meseca na temperaturi između +2 °C i +8 °C.

Konjugat: razblažiti konjugat 9310-09 u rastvoru pufera za razblaživanje (konačno razblaženje 1/50). Razblažiti konjugat na dan testiranja. Ne čuvati razblaženi konjugat.

Rastvor supstrata: rastvoriti tabletu(e) supstrata fosfataze 9310-10 u nerazblaženom enzimskom puferu 9310-04 (1 tableta u 2.5 ml pufera). Vorteksirati do potpunog rastvaranja tablete. Razblažiti supstrat na dan testiranja i zaštititi epruvetu od direktne svetlosti. Tablete i rastvori supstrata treba da budu bezbojni ili da imaju samo blagu žutu nijansu. Ako tableta ili rastvor supstrata požute, možda su delimično hidrolizovani i treba ih odložiti u otpad. Ne čuvati rastvor supstrata.

Rastvor za zaustavljanje reakcije: Koristiti nerazblažen reagens 9310-05.

Uzimanje i priprema uzoraka:

Koristiti humani serum. Čuvati na temperaturi između +2 °C i +8 °C ako će se analizirati u roku od 7 dana, u suprotnom čuvati na -20 °C ili niže. Izbegavati ponavljano zamrzavanje i odmrzavanje. Uzorke vorteksirati i razblažiti u odnosu 1/201 u rastvoru pufera za razblaživanje (npr. 5 µl uzorka u 1,0 ml). Ne čuvati razblažene uzorke.

Upozorenja i mere predostrožnosti:

Toksična jedinjenja se nalaze u sledećim koncentracijama:

Komponenta	Referenca	Natrijum-azid (NaN ₃)	Mertiolat
Pufer za razblaživanje (10 x)	9310-02	0,1 %	0,02 %
Rastvor za ispiranje (10 x)	9310-03	0,05 %	/
Enzimski pufer	9310-04	0,01 %	/
Kontrolni serumi (20 x)	9310-06 do -08	0,1 %	0,02 %
Konjugat (50 x)	9310-09	0,1 %	/

Pri upotrebljenim koncentracijama, natrijum-azid i mertiolat nemaju nikakav toksikološki rizik u kontaktu sa kožom i sluzokožom.

Komponenta	Opasna komponenta	Piktogram opasnosti	Obaveštenje o opasnosti	Obaveštenje o merama predostrožnosti
Rastvor za zaustavljanje reakcije	Kalijum-fosfat, trobazni		Dovodi do teškogoštećenja oka	Nositi zaštitu za oči. AKO DOSPE U OČI: Pažljivo ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktna sočiva, ukoliko postoje i ukoliko je to moguće učiniti. Nastaviti sa ispiranjem.

- Negativni, granicni (cut-off) i pozitivni kontrolni serumi (9310-06 do -08) su animalnog porekla (zec) i njima treba rukovati sa oprezom.
- Sve reagense i uzorke tretirati kao potencijalno infektivan materijal.
- Ne kombinovati reagense različitih lotova ili Bordier ELISA kompleta.
- Ne koristiti reagense drugih proizvođača sa reagensima ovog kompleta.
- Ne koristiti reagense nakon isteka roka upotrebe.
- Odmah nakon upotrebe čvrsto zatvoriti bočice reagenasa i ne menjati čepove kako bi se izbegla kontaminacija.
- Koristiti posebne i čiste nastavke za pipete za svaki uzorak.
- Ne koristiti mikrojamiice ponovo.

- Sprečiti oštećenje mikrojamica mehaničkim delovanjem (nastavci, mlaznice).
- Opisi simbola koji se koriste na etiketama mogu se naći na sajtu www.bordier.ch.

Razmatranja odlaganja:

Svi materijali koji se koriste za ovaj test se generalno smatraju opasnim otpadom. Pogledati nacionalne i regionalne zakone i propise za odlaganje opasnog otpada.

Procedura:

Prilikom testiranja izbegavati stvaranje mehurića u jamiicama.

Korak 1: Preinkubacija:

Napuniti jamiice sa 250 µl rastvora pufera za razblaživanje.

Inkubirati 5 do 15 minuta između +20°C i +30°C.

Ukloniti pufer za razblaživanje aspiracijom ili trešenjem jamiica preko sudopera.

Korak 2: Inkubacija sa uzorcima:

Prvu jamiicu prvog stripa napuniti samo sa 100 µl pufera za razblaživanje (slepa proba bez seruma).

Naredne tri jamiice napuniti sa 100 µl razblaženog negativnog, slabo pozitivnog (cut-off) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove više od 25 uzoraka, preporučujemo da se poslednje tri jamiice ispune kontrolnim serumima u duplikatu.

Preostale jamiice ispuniti razblaženim uzorcima (po 100 µl).

Pokriti jamiice adhezivnom trakom i inkubirati 30 minuta na +37°C.

Ukloniti serum i isprati 4 x sa približno 250 µl rastvora za ispiranje.

Korak 3: Inkubacija sa konjugatom:

Distribuirati 100 µl razblaženog konjugata u svaku jamiicu (uključujući slepu probu bez seruma).

Pokriti jamiice adhezivnom trakom i inkubirati 30 minuta na +37°C.

Ukloniti konjugat i isprati 4 x sa približno 250 µl rastvora za ispiranje.

Korak 4: Inkubacija sa supstratom:

Distribuirati 100 µl rastvora supstrata po jamiici.

Pokriti jamiice adhezivnom trakom i inkubirati 30 minuta na +37°C.

Zaustaviti reakciju dodavanjem 100 µl rastvora za zaustavljanje reakcije u svaku jamiicu.

Korak 5: Merenje apsorbancija:

Ako je potrebno, obrisati dno jamiica i ukloniti mehuriće. Izmeriti apsorbanciju na 405 nm u roku od 1 sata nakon dodavanja rastvora za zaustavljanje reakcije.

Tumačenje:

Oduzeti vrednost slepe probe bez seruma od svih izmerenih vrednosti. Kada je primenjivo, izračunati srednje vrednosti apsorbancije dupliranih kontrola u serumu. Test je validan ako su ispunjeni sledeći kriterijumi:

- Apsorbancija pozitivne kontrole > 1,200
- Apsorbancija slabe pozitivne kontrole > 3% apsorbancije pozitivne kontrole
- Apsorbancija negativne kontrole < 3% apsorbancije pozitivne kontrole
- Apsorbancija slepe probe bez seruma < 0,350

U slučaju da uzorak daje signal koji prelazi merni opseg čitača mikroploče, treba dodeliti vrednost koja odgovara gornjem mernom opsegu čitača.

Kontrole kvaliteta tekućih lotova objavljene su na našoj veb stranici: www.bordier.ch.

Koncentracija antitela u slabo pozitivnom (cut-off) serumu 9310-07 podešena je tako da optimalno razlikuje serume klinički dokumentovanih slučajeva alveolarne ehinokokoze i seruma zdravih osoba. Indeks granične vrednosti (cut-off index) uzorka definisan je, nakon oduzimanja vrednosti slepe probe bez seruma, kao:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{Apsorbancija uzorka}}{\text{Apsorbancija cut-off seruma}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka manji od **1,0**. U ovom slučaju, koncentracija IgG antitela na *Echinococcus multilocularis* antigene je klinički bez značaja.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka veći ili jednak **1,0**. U ovom slučaju, koncentracija IgG antitela na *Echinococcus multilocularis* antigene se smatra klinički značajnom.

Smanjenje ili negativizacija nivoa serumskih antitela protiv recEm18 ukazuje na potpunu hiruršku reakciju parazitske lezije ili inaktivaciju parazita lečenjem lekovima. U slučaju pozitivnog ili sumnjivog rezultata, preporučujemo da izvršite potvrdni test (najčešće Western blot) ako je takav test dostupan ili propisan nacionalnim propisima.

Analitičke performanse:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 100% utvrđena je kod 12 seruma pacijenata sa drugim parazitskim infekcijama (6 cističnih ehinokokoza, 3 nediferencirane ehinokokoze i 3 alternativne dijagnoze).

Nije primećena pozitivna ili negativna interferencija sa suprafiziološkim koncentracijama hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumu sa dodatkom interferenta.

Preciznost:

Ponovljivost je procenjena testiranjem 2 uzorka humanog seruma u 24 jamiice na 1 testu.

Reproducibilnost je procenjena testiranjem 2 uzorka humanog seruma u duplikatu na 10 različitih testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 1	Uzorak 2
Prosek (apsorbancija)	0,186	1,260	0,157	1,123
Standardna devijacija (apsorbancija)	0,022	0,072	0,016	0,076
Koeficijent varijacije (%)	11,8	5,7	10,5	6,8

Kliničke performanse:

Dijagnostička senzitivnost:

Ispitivani su upareni pre- i postoperativni serumski uzorci 12 pacijenata sa potvrđenom alveolarnom ehinokokozom koji su imali radikalnu ili neradikalnu operaciju. Pre operacije, 9 pacijenata (75%) imalo je indeks >1. Među tim pacijentima, 5 je imalo negativne postoperativne rezultate. Međutim, kod svih 12 pacijenata, postoperativni nivoi Em18 antitela su opali i bili su značajno niži nego u preoperativnim uzorcima. Proučavani su uzorci seruma 25 pacijenata sa potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez hirurške intervencije, ali sa stabilnom bolešću pod antiparazitskom hemioterapijom. Njih 18 (72%) imalo je indeks >1 (medijana indeksa 6,3). Proučavani su uzorci seruma 7 pacijenata sa potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez hirurške intervencije, ali sa progresivnom bolešću pod antiparazitskom hemioterapijom. Njih 6 (86%) imalo je indeks >1 (medijana indeksa 13,8).

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 98% utvrđena je kod 99 seruma davalaca krvi (Švajcarska). Specifičnost od 94% utvrđena je na 100 seruma pacijenata iz infektioške jedinice (Švajcarska).

Pozitivna i negativna prediktivna vrednost:

PPV od 80% i NPV od 96% pronađeni su kod gore navedenih populacija.

Očekivane vrednosti u normalnoj i pogođenoj populaciji:

U normalnoj populaciji 99 švajcarskih davalaca krvi i 100 seruma iz švajcarske infektioške jedinice, očekivana vrednost indeksa je 0,33. Podaci o očekivanoj vrednosti indeksa u oboleloj populaciji nisu bili dostupni.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji se dogodi u vezi sa proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom organu države članice u kojoj korisnik i/ili pacijent ima sedište.

Ograničenja:

Dijagnoza infektivne bolesti ne sme se postaviti na osnovu rezultata jednog testa. Precizno postavljanje dijagnoze treba da uzme u obzir endemsku situaciju, kliničku anamnezu, simptomatologiju, rezultate snimanja, kao i serološke podatke.

Kod imunokompromitovanih pacijenata i novorođenčadi, serološki podaci imaju ograničenu 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. 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., Nahorski, 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**:20239.



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

