

Echinococcus granulosus IgG ELISA

Immuno-enzymatische test voor de diagnose van echinokokkose bij mensen

96 testen op deelbare strips bedoeld voor in-vitro diagnostisch en professioneel laboratoriumgebruik



Instructies voor het gebruik van het artikel N° 9350
UDI-DI: 07640158219355



Wordt gebruikt voor:

De kit *Echinococcus granulosus* IgG ELISA van Bordier is bedoeld voor kwalitatieve detectie van IgG-antilichamen tegen *Echinococcus granulosus* (en *Echinococcus multilocularis*) in humaan serum. Serologie is een hulpmiddel bij diagnose en kan niet gebruikt worden als enige manier van diagnostisering.

Achtergrond:

Cystische echinokokkose, ook bekend als hydatidose, wordt veroorzaakt door het larvestadium van *Echinococcus granulosus*, een lintworm die gevonden wordt in honden. Als intermediaire gastheer dragen schapen runderen en varkens hydatidose-cysten bij zich in met name lever en longen. Mensen kunnen geïnfecteerd raken na accidentele inname van lintwormeitjes in besmette grond, voedsel en water. De parasietlarven ontwikkelen zich vervolgens ook dan met name in lever en longen tot hydatidose-cysten. De belangrijkste symptomen verschijnen als de hydatidose-cysten groot genoeg zijn om orgaanstoornissen te veroorzaken, alsmede een onbehaaglijk gevoel, pijn, misselijkheid en braken. Diagnostiseren is gebaseerd op beeldvormende technieken zoals CT-scans, echografie en MRI's met daarop duidelijk omlijnde cyste(n) bij een persoon met een verleden aan blootstelling en een positieve serologische uitslag.

Principe en presentatie:

De kit bevat al het materiaal dat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare microtitratiestripjes die gesensibiliseerd zijn met *Echinococcus granulosus* hydatidosevloei-stof-antigenen. Specifieke antilichamen in het monster binden zich aan deze antigenen en door wassen worden onspecifieke antilichamen verwijderd. De aanwezigheid van parasiet-specifieke antilichamen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat. Middels een tweede wasbeurt wordt ongebonden conjugaat verwijderd. Om gebonden antilichamen te detecteren wordt pNPP-substraat toegevoegd, dat bij aanwezigheid van alkalinefosfatase geel kleurt. Kleurintensiteit is in proportie met de hoeveelheid *Echinococcus granulosus*-specifieke antilichamen in het monster. Na toevoegen van kaliumfosfaat stopt de reactie. Absorptie bij 405 nm wordt gelezen met gebruik van een ELISA-microplaatlezer.

De test is handmatig, maar kan worden uitgevoerd met automatische systemen, die moeten worden gevalideerd door de gebruiker.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

WELL	9350-01	Deelbare ELISA strips, gesensibiliseerd met <i>Echinococcus granulosus</i> hydatidosevloei-stof-antigenen	96	wells
DILB	9350-02	Verduunningsbuffer (10 x geconcentreerd), paars van kleur	50	ml
WASH	9350-03	Wasvloei-stof (10 x geconcentreerd)	50	ml
ENZB	9350-04	Enzymbuffer	50	ml
STOP	9350-05	Stopoplossing (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Negatief controleserum (20x), groene dop	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Zwak-positief controleserum (drempel, 20 x), gele dop	200	µl
CONTROL +	9350-08	Positief controleserum (20 x), rode dop	200	µl
CONJ	9350-09	Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat (50 x), paarse dop	300	µl
SUBS	9350-10	Fosfatasesubstraat (para-nitrofenylfosfaat)	20	tabletten
		Multipipet reservoir, 25 ml	1	stuks
		Kader voor ELISA 8-wellshouder	1	stuks

Bewaar condities:

Bewaar de kit tussen +2°C en +8°C (transport gevalideerd tussen -20°C en +37°C gedurende 21 dagen), vermijd langdurige blootstelling van de bestanddelen aan direct licht. Vervaldatum en productienummer van de kit staan vermeld op de zijkant van de doos. Na openen zijn alle reagens tot aan de vervaldatum stabiel, mits bewaard tussen +2°C en +8°C.

Benodigd materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (ml en µl). Bakjes. Verdunningstubes voor sera. Plakband voor afdekken van de stripjes tijdens incubatie. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op +37°C. ELISA lezer afgesteld op 405 nm. Handmatige of geautomatiseerde apparatuur voor het afspoelen van de wells. Vortexmixer. Timer.

Vorbereiding van de reagens:

Breng alle reagentia minimaal 1 uur op een temperatuur tussen +20°C en +30°C en meng ze voor gebruik.

ELISA strips: open de zijkant van aluminiumzak 9350-01 en neem het aantal benodigde strips eruit (eentje voor serumvrije blanco, drie voor controles, plus het aantal monsters). Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8-wells-houder(s). Vul de lege plekken van de houder zo nodig met gebruikte wells. Plaats de houder(s) in de juiste richting in de lijst. Hersluit de geopende verpakking met silicagel kussentje.

Verduuningsbuffer: verdun de geconcentreerde verduuningsvloeistof (10 x) 9350-02, 1:10 met gedestilleerd water. Dit wordt gebruikt voor verdunning van controles, monsters en conjugaat. De verduuningsvloeistof is tussen +2°C en +8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Wasoplossing: verdun de geconcentreerde wasoplossing (10 x) 9350-03, 1:10 met gedestilleerd water. U kunt ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Vermijd het gebruik van fosfaat-houdende buffers, aangezien dit de enzymatische activiteit van alkalische fosfatase kan verhinderen. De verdunde wasvloeistof is tussen +2°C en +8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Controlesera: verdun 10 µl controlesera 9350-06 tot -08 in 190 µl verduuningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:20). Het verdunde controleserum is tussen +2°C en +8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Conjugaat: verdun conjugaat 9350-09 met verduuningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:50). Verdun conjugaat op de testdag zelf. Het verdunde conjugaat niet bewaren.

Substraatoplossing: los de tablet(ten) fosfatesubstraat 9350-10 op in de onverdunde enzymbuffer 9350-04 (1 tablet in 2,5 ml buffer). Vortex tot de tablet(ten) volledig is/zijn opgelost. Verdun het substraat op de testdag zelf en bescherm het buisje tegen direct licht. Tabletten en substraatoplossingen dienen kleurloos of hooguit lichtgeel van kleur te zijn. Kleurt een tablet of substraatoplossing geel, dan kan het deels gehydrolyseerd zijn en dient weggegooid te worden. De substraatoplossing niet bewaren.

Stopoplossing: gebruik reagens 9350-05 onverdund.

Monstercollectie en voorbereiding:

Gebruik humaan serum. Bewaren tussen +2°C en +8°C indien binnen 7 dagen geanalyseerd, anders bewaren bij -20°C of lager. Vermijd herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Vortex de monsters en verdun tot 1:201 in verduuningsbuffer (bijv. 5 µl monster in 1,0 ml). Bewaar geen verdunde monsters.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen:

Toxische bestanddelen in de volgende concentraties:

Bestanddeel	Referentie	Natriumazide (NaN_3)	Thiomersal
Verduuningsbuffer (10 x)	9350-02	0,1%	0,02%
Wasoplossing (10 x)	9350-03	0,05%	/
Enzymbuffer	9350-04	0,01%	/
Controlesera (20 x)	9350-06 tot -08	0,1%	0,02%
Conjugaat (50 x)	9350-09	0,1%	/

In de gebruikte concentraties zijn er voor natriumazide en thiomersal geen toxicologische risico's als gevolg van aanraking met huid of slijmvliezen.

Bestanddelen	Gevaarlijk bestanddelen	Gevaar pictogram	Gevaarverklaring	Voorzorgsmaatregel
Stopoplossing	Kaliumfosfaat, tribasisch		Veroorzaakt ernstig oogletsel	Beschermende oogbescherming dragen BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen.

- De negatieve, zwak-positieve en positieve controlesera (9350-06 tot -08) zijn van dierlijke oorsprong (konijnen) en moeten met zorg worden behandeld.
- Behandel alle reagens en monsters als potentieel geïnfecteerd materiaal.
- Gebruik niet de reagens van andere partijen of andere Bordier ELISA-kits.
- Gebruik geen reagens van andere fabrikanten met reagens voor deze kit.
- Gebruik geen reagens waarvan de vervaldatum is verlopen.
- Sluit de ampullen reagens direct na gebruik stevig af. Gebruik voor elk ampul uitsluitend de bijbehorende dop (niet de dop van andere ampullen). Dit om verontreiniging te voorkomen.
- Gebruik voor elk monster een eigen en schoon pipetpipje.
- De microwells niet hergebruiken.
- Voorkom verslechtering van de microwells door mechanische actie (tips/kegels, nozzles).
- De beschrijvingen van symbolen die op de etiketten worden gebruikt, zijn te vinden op de website www.bordier.ch.

Wegwerpbeleid:

Alle materialen zoals gebruikt bij deze test worden gezien als gevaarlijke afvalstoffen. Raadpleeg de landelijke en regionale wet- en regelgeving voor het verwijderen van gevaarlijk afval.

Methode:

Voorkom tijdens de testfase luchtbelvorming in de wells.

Stap 1: Voorincubatie:

Vul de wells met 250 µl verdunningsbuffer.

Incubeer gedurende 5 tot 15 minuten tussen +20°C en +30°C.

Verwijder de verdunningsbuffer door afzuigen of leegschudden van de wells boven de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met de monsters:

Vul het eerste well van de eerste strip met 100 µl verdunningsbuffer (serumvrije blanco).

Vul de volgende 3 wells met respectievelijk 100 µl verdund negatief, zwak-positief (drempel) en positief controleserum. Voor testen met meer dan 25 monsters is het advies om de drie laatste wells als duplicaat met controlesera te vullen.

Vul de resterende wells met de verdunde monsters (100 µl per stuk).

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij +37°C.

Verwijder de sera en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Vul elk well (inclusief serumvrije blanco) met 100 µl verdund conjugaat.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij +37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Vul elk well met 100 µl substraatoplossing.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij +37°C.

Stop de reactie door aan elk well 100 µl stopoplossing toe te voegen.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog zo nodig de onderkant van de wells en verwijder luchtbelletjes. Meet absorptie bij 405 nm binnen 1 uur na toevoegen van de stopoplossing.

Interpretatie:

Trek de waarde van de serumvrije blanco van alle gemeten waarden af. Bereken indien van toepassing de gemiddelde absorptiewaarde van de herhaalde serumcontroles. De test is betrouwbaar als deze aan de volgende criteria voldoet:

- Absorptie (A) van de positieve controle > 1,200
- A van zwakke positieve controle > 27% A van positieve controle
- A van de negatieve controle < 8% van A van de positieve controle
- A van serumvrije blanco < 0,350

Als het signaal van het monster het meetbereik van de microplaatlezer overschrijdt, moet de waarde die overeenkomt met het bovenste meetbereik van de lezer worden toegekend.

Kwaliteitscontroles van de huidige partijen kunt u vinden op onze website: www.bordier.ch.

De titer van het zwak-positief serum 9350-07 (drempel) wordt vastgesteld om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van echinokokkose en normaal menselijk serum optimaal te duiden. De drempelwaarde van een monster wordt, na aftrekken van de serumvrije blanco, als volgt gedefinieerd:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorptie monster}}{\text{Absorptie zwak-positief (drempel) serum}}$$

Het resultaat is **negatief** als de index van het geanalyseerde monster lager is dan **1,0**. In dat geval is de titer van de IgG-antilichamen tegen **Echinococcus granulosus** antigenen klinisch niet significant.

Het resultaat is **positief** als de index van het geanalyseerde monster hoger is dan of gelijk is aan **1,0**. In dat geval wordt de titer van de IgG-antilichamen tegen **Echinococcus granulosus** antigenen als klinisch significant gezien. Dit betekent dat de patiënt in contact is geweest met de parasiet.

Op basis van haar patiëntenpopulatie kan elk laboratorium een grijs gebied bepalen. In geval van twijfelachtige of borderline resultaten is het advies om de test 2-4 weken later met een vers monster te herhalen.

In geval van een positief of twijfelachtig resultaat raden wij aan een bevestigingstest uit te voeren (meestal door western blot) indien een dergelijke test beschikbaar of vereist is volgens de nationale regelgeving.

Analytische prestaties:

Analytische specificiteit:

Een specificiteit van 87% werd gevonden bij 270 sera van patiënten met andere parasitaire infecties. Kruisreactiviteit komt voornamelijk voor bij patiënten met strongyloïdose, filariose en cysticercose.

Er werd geen positieve of negatieve interferentie waargenomen met suprafysiologische concentraties hemoglobine, lipiden of bilirubine in sera aangevuld met interfererende stoffen.

Nauwkeurigheid:

Herhaalbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 humane sera in 24 wells in één enkel experiment.

Reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 monsters in duplo bij 10 verschillende experimenten.

	Herhaalbaarheid		Reproduceerbaarheid	
	Monster 1	Monster 2	Monster 1	Monster 2
Gemiddeld (absorptie)	0,586	1,416	0,684	1,654
Standaardafwijking (absorptie)	0,027	0,064	0,033	0,085
Variatiecoëfficiënt (%)	4,6	4,5	4,8	5,1

Klinische prestaties:

Diagnostische gevoeligheid:

Een gevoeligheid van 95% werd gevonden bij 200 sera van patiënten met cystische echinokokkose. Een gevoeligheid van 99% werd gevonden bij 67 sera van patiënten met alveolaire echinokokkose. Positieve en twijfelachtige resultaten moeten opnieuw worden getest met het *Echinococcus multilocularis*-specifieke Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, artikel N° 9300) om de infecterende *Echinococcus*-soort te identificeren.

Diagnostische specificiteit:

Een specificiteit van 96% werd gevonden bij 500 sera van (Zwitserse) bloeddonoren.

Positieve en negatieve voorspellende waarde:

Voor cystische echinokokkose: een PPV van 91% en een NPV van 98% werden gevonden met de bovengenoemde populaties.

Voor alveolar echinococcosis: een PPV van 78% en een NPV van 99% werden gevonden met de bovengenoemde populaties.

Verwachte waarden bij normale en getroffen populaties:

In een normale populatie van 99 Zwitserse bloeddonoren en 100 sera van een Zwitserse infectiologie-eenheid is de verwachte indexwaarde 0,21. In een getroffen populatie van 5 sera bij patiënten met cystische echinokokkose is de verwachte indexwaarde 2,57.

Incidenten:

Elk ernstig incident in verband met het apparaat moet worden gemeld aan de fabrikant en aan de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

Beperkingen:

Eén enkele testuitslag is niet voldoende om een infectieziekte te diagnosticeren. Een exacte diagnose dient tevens rekening te houden met de endemische context, klinische voorgeschiedenis, symptomatologie, beeldvorming en serologische data.

De waarde van serologische data bij pasgeborenen en patiënten met immunodeficiëntie is beperkt.

Referenties:

Gottstein, B. (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. 5 : 248-261.

Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S. and Eckert, J. (1993) Improved primary immunodiagnosis of Alveolar Echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. J. Clin. Microbiol. 31: 373-376.

Fekova, M., Antolova, D. and Reiterova, K. (2020) A comparative study of different immunoassays to detect specific antibodies to Echinococcus spp. in human sera. Helminthologia 57 : 219-225.

Shmueli, M., Van Buren, J., Sagi, O., Grupel, D., Sheves, A., Assi, Z. and Ben-Shimol, S. (2024) Performance of Echinococcosis Serology is Associated with Disease Endemicity, Hydatid Cyst Location, Eosinophilia, Imaging Finding, and Treatment. Acta Parasitologica 69 : 233-241.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

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

