

Echinococcus multilocularis (Em2-Em18) IgG ELISA

Imunološko određivanje enzima za dijagnozu ljudske alveolarne ehinokokoze

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



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Upute za upotrebu za br. artikla **9300**
Reg. Br. EZ-a: H-CH/CA01/IVD/01757 - UDI-DI: 07640158219300



Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em2-Em18) IgG ELISA namijenjen je za kvantitativno prepoznavanje antitijela protiv parazita *Echinococcus multilocularis* u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda.

Pozadina:

Alveolarnu ehinokokožu uzrokuje stadij ličinke trakavice *Echinococcus multilocularis* koja se može pronaći u lisica, kojota, pasa i drugih psolikih zvijeri. Ljudi se mogu zaraziti slučajnom konzumacijom zaraženih jajašaca trakavice iz kontaminirane hrane ili vode. Oblici ličinki *E. multilocularis* ne sazrijevaju u cijelosti u plodne ciste u ljudima, no trajna proliferacija vezikula koje prodiru u okolno tkivo i uništavaju ga uzrokovat će, nalik tumoru, disfunkciju jetara. Parazit se može širiti i u druge organe kao što su pluća i mozak. Glavni su simptomi bol u truhu, astenija, hepatomegalija i žutica. Dijagnoza se temelji na metodama snimanja kao što su CT snimke radi vizualnog prepoznavanja parazitskih nakupina i povezana difuziranja struktura nalik cistama. Serološka testiranja upotrebljavaju se za pregled rizičnih populacija i naknadne pretrage bolesnika koji boluju od alveolarne ehinokokoze nakon liječenja.

Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranih antigenima Em2-Em18 *Echinococcus multilocularis*. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Echinococcus multilocularis* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test se može provesti automatskim sustavima, no to mora potvrditi korisnik.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	9300-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane antigenima Em2-Em18 <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	jažica
DILB	9300-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
WASH	9300-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
ENZB	9300-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	9300-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
CONTROL -/+	9300-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
CONTROL +	9300-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
CONJ	9300-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
SUBS	9300-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet na temperaturi od 2 °C do 8 °C (transportirajte na okolnoj temperaturi), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i LOT broj kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi od 2°C do 8°C.

Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na 37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

Priprema reagensa prije upotrebe:

Osigurajte da svi reagensi budu na sobnoj temperaturi i pomiješajte ih prije upotrebe.

Jažice ELISA: otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9300-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

Pufer za razrjeđivanje: razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9300-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Otopina za ispiranje: razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9300-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Kontrolni serumi: razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9300-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Konjugat: razrijedite konjugat 9300-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

Otopina supstrata: otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9300-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9300-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

Otopina za zaustavljanje: upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9300-05.

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum se treba čuvati na temperaturi od 2°C do 8°C ako će se analizirati unutar nekoliko dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje. Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml).

Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N _a N ₃)	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9300-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	9300-03	0,05%	/
Enzimski pufer	9300-04	0,01%	/
Kontrolni serumi (20 x)	9300-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9300-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

- Otopina za zaustavljanje 9300-05 (0,5 M K₃PO₄) ima nadražujuć učinak.
- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9300-06 do -08) potječu od kunića.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense ni različite LOT brojeve kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.
- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu www.bordier.ch.

Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

1. korak: Blokiranje:

U cijelosti napunite jažice otopinom pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 – 15 minuta na sobnoj temperaturi (blokiranje).

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

5. korak: Mjerenje apsorcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 14% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 6% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

Kontrole kvalitete trenutačnih LOT brojeva objavljene su na našem web-mjestu www.bordier.ch.

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9300-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva alveolarne ehinokokoze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **1,0**. U ovom je slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Echinococcus multilocularis* klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka viši od **1,0**. U ovom se slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Echinococcus multilocularis* smatra klinički značajnom. To označava da je bolesnik bio u dodiru s parazitom.

Svaki laboratorij može definirati sivu zonu u skladu sa svojom bolesničkom populacijom. U slučaju graničnih ili sumnjivih rezultata preporučujemo ponavljanje testa nakon 2 - 4 tjedna upotrebom svježeg uzorka.

U slučaju sumnjiva rezultata preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

Analitički rezultati:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 84 % pronađena je u 63 seruma bolesnika koji boluju od cistične ehinokokoze. Specifičnost od 93 % pronađena je u 46 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija. Unakrižna reaktivnost poglavito nastupa u bolesnika s trihinelozom, fasciolijazom i cisticercozom.

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

Preciznost:

Ponovljivost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 10 različitih testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjeak (apsorpcija)	0,647	1,518	0,580	1,407
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,033	0,058	0,026	0,064
Koeficijent varijacije (%)	5,1	3,8	4,5	4,6

Sljedeći rezultati ne mogu se procijeniti jer ne postoji potvrđeni referentni materijal za tu analizu:

- analitička osjetljivost (ograničenja prepoznavanja i kvantizacije)
- točnost
- istinitost
- mjerni raspon
- linearnost.

Klinički rezultati:

Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 83 % pronađena je u 151 serumu od bolesnika koji boluju od alveolarne ehinokokoze.

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 98 % pronađena je u 114 seruma (švicarskih) darivatelja krvi, 100 seruma bolesnika iz (švicarske) infektološke jedinice i 52 seruma od bolesnika kod kojih se sumnja na alveolarnu ehinokokožu, no kod kojih je postojanje bolesti sa sigurnošću isključena.

Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 95% i NPV od 91% pronađene su u spomenutim populacijama.

Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 114 švicarskih darivatelja krvi, 100 seruma iz švicarske infektološke jedinice i 52 seruma od bolesnika kod kojih se sumnja na alveolarnu ehinokokožu, no kod kojih je postojanje bolesti sa sigurnošću isključeno, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,19. U pogođenoj populaciji od 151 seruma od bolesnika koji boluju od alveolarne ehinokokoze, očekivana indeksna vrijednost iznosi 2,76.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

Reference:

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.

Müller, N., Frei, E., Nuñez, S. and Gottstein, B. (2006) Improved serodiagnosis of alveolar echinococcosis of humans using an in vitro-produced Echinococcus multilocularis antigen. Parasitology. **134** : 1-10.

Knapp, J., Sako, Y., Grenouillet, F., Bresson-Hadni, S., Richou, C., Gbaguidi-Haore, H., Ito, A., Millon, L. (2014) Comparison of the serological tests ICT and ELISA for the diagnosis of alveolar echinococcosis in France. Parasite. **21**.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Biokema Building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Švicarska.

Telefon: + 41 21 633 31 67, telefaks: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

