

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för serologisk uppföljning av mänskliga alveolär echinokockos

96 analyser på enskilda brunnar för in vitro diagnostisk användning och för professionell laboratorieanvändning



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Instruktioner för användning av artikel N° 9310
N° reg. CE: CH-201708-0010 - UDI-DI: 07640158219317



Avsedd användning:

Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA kitet är avsedd för kvantitativ upptäckt av IgG antikroppar mot Em18 antigen av *Echinococcus multilocularis* i humant serum. Detta test är till för- kirurgisk och/eller för- terapeutisk uppföljning av infekterade patienter

Bakgrund:

Alveolär echinokockos orsakas av larvstadiet av *Echinococcus multilocularis*, en bandmask som finns i rävar, prärievarg, hundar och några andra husdjur. Människor kan smittas av oavsiktligt intag av lungmask-ägg på förorenad mat eller i vatten. Larvformarna av *E. multilocularis* mognar inte fullt ut i gödselcystor hos människor, men kontinuerlig proliferation av blåsor som invaderar och förstör omgivande vävnader, kommer på ett tumörliknande sätt att orsaka leverdysfunktion. Parasiten kan sprida sig i andra organ så som lungor och hjärna. De huvudsakliga symtomen är buksmärta, asteni, hepatomegali och gulsot. Diagnosen är baserad på bildteknik som CT-skanningar för att visuellt detektera parasitmassor och respektive diffusa cystliknande strukturer. Serologiska tester används för screening av populationer i riskzonen och för uppföljande AE-patienter efter behandling.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på ömtåliga mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Echinococcus multilocularis* Em18 rekombinant antigener. Specifika antikroppar i testet kommer att binda dessa antigener och tvättning kommer ta bort ospecifika antikroppar. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Ett andra tvättsteg kommer att avlägsna obundet konjugat. Återgivning av bundna antikroppar görs genom tillsats av pNPP-substrat som blir gult i närvaro av alkaliskt fosfatas. Färgintensiteten är proportionell mot mängden av *Echinococcus multilocularis* specifika antikroppar i provet. Kaliumfosfat tillsättes för att stoppa reaktionen. Absorbans vid 405 nm läses med användning av en ELISA-mikroplatta läsare. Testet kan utföras med automatiska system, men detta måste valideras av användaren.

Material som ingår i kitet (96 provningar):

WELL	9310-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinant antigener	96	brunnar	
DILB	9310-02	Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila	50	ml	
WASH	9310-03	Tvättlösning (10 x) koncentrat	50	ml	
ENZB	9310-04	Enzymbuffert	50	ml	
STOP	9310-05	Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml	
CONTROL	-	9310-06	Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock	200	µl
CONTROL	-/+	9310-07	Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock	200	µl
CONTROL	+	9310-08	Positivt kontrollserum (20 x), rött lock	200	µl
CONJ	9310-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock	300	µl	
SUBS	9310-10	Fosfatas substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter	
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck	
		Ram för ELISA 8-brunnhållare	1	styck	

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8°C (transportera vid omgivningstemperatur). Undvik långvarig exponering av komponenterna för direkt ljus. Utgångsdatumet och partinumret av kitet anges på sidan av lådan. Efter första öppningen är alla reagens stabila till och med utgångsdatumet när de lagras vid 2-8°C.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för spädnings av sera. Limtejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37°C. ELISA läsare inställd på 405 Nm. Manuell eller automatisk utrustning för sköljning av brunnar. Vortex-blandare. Timer.

Preparationer av reagens innan användning:

Få alla reagens till rumstemperatur och blanda före användning.

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9310-01 och ta bort antal brunnar som behövs (en för blank, tre för kontroller, plus antal prov). Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Spädningsbuffert: utspädd spädningsbuffert (10 x) koncentrat 9310-02, 1/10 i destillerat vatten. Detta används för utspädning av kontroller, prover och konjugat. Den utspädda bufferten är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Tvättlösning: utspädd tvättlösning (10 x) koncentrat 9310-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvättlösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas. Den utspädda tvättlösningen är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Kontrollsera: utspädd 10 µl kontrollsera 9310-06 till -08 i 190 µl spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/20). Det utspädda kontrollsera är stabilt i 2 månader vid 2-8°C.

Konjugat: utspädd konjugat 9310-09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: upplös tabletter av fosfatas substrat 9310-10 i utspädd buffert 9310-04 (1 tablett i 2,5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett/erna. Späd substratet på analysdagen och skydda röret från direkt ljus. Tabletter och substratlösningar borde vara färglösa, eller bara ha en ljusgul skiftning. Om en tablett eller en substratlösning blir gul kan den ha delvis hydrolyserats och bör kasseras. Förvara inte substratlösningen.

Stopplösning: använd reagens 9310-05 utspädd.

Provtagning och förberedning

Använd humant-serum. Serum bör förvaras vid 2-8°C om det analyseras inom några dagar, annars lagras vid -20°C eller lägre. Undvik upprepade frysning och upptining.

Vortexprover och späd 1/201 i spädningsbuffertlösning (t.ex. 5 µl prov i 1,0 ml).

Varningar och säkerhetsåtgärder:

Giftiga föreningar finns i följande koncentration:

Komponent	Referens	Natriumazid (N _a N ₃)	Mertiolat
Spädningsbuffert (10 x)	9310-02	0,1%	0,02%
Tvättlösning (10 x)	9310-03	0,05%	/
Enzybuffert	9310-04	0,01%	/
Kontrollsera (20 x)	9310-06 till -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9310-09	0,1%	/

Vid de använda koncentrationerna har natriumazid och merthiolat ingen toxikologisk risk vid kontakt med hud och slemhinnor.

- Stopplösningen 9310-05 (0.5 M K₃PO₄) är irriterande.
- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (9310-06 till -08) är från kaniner.
- Behandla alla reagens och prov som potentiellt infektiöst material.
- Byt inte reagenser av olika partier eller Bordier ELISA-kit.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagens i denna utrustning.
- Använd inte reagens efter dess utgångsdatum.
- Stäng reagensflaskorna tätt omedelbart efter användning, och byt inte ut skruvlock för att undvika förorening.
- Använd separata och rena pipetter-tips för varje prov.
- Återanvänd inte mikrobrunnar.
- Undvik försämring av mikrobrunnarna genom mekanisk verkan (spetsar/koner, munstycken).
- Beskrivningarna av symboler som används på etiketterna finns på webbplatsen www.bordier.ch.

Avfallshantering:

Alla material som används för detta test anses allmänt som farligt avfall. Se nationella och regionala lagar och förordningar för bortskaffande av farligt avfall.

Procedur:

Vid körning av analysen, undvik bildandet av bubblor i brunnarna.

Steg 1: Blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffertlösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort spädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: Inkubation med prover:

Fyll den första brunnen i remsan med 100 µl spädningsbuffert (inget serumblankt).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med respektive 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontrollsera. För analyser av mer än 25 prover rekommenderar vi att fylla de tre sista brunnarna med kontrollsera som ett duplikat.

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid 37°C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 3: Inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn (inklusive det inget serumblankt).

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid 37°C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 4: Inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med limtejp och inkubera i 30 minuter vid 37°C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Om det behövs, torka botten av brunnarna och eliminera bubblor. Mät absorbanserna vid 405 Nm inom 1 timme efter tillsatsen av stopplösning.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serumblankt från alla mätvärden. Beräkna de genomsnittliga absorbansvärdena för duplicerade serumkontroller när det är tillämpligt. Testet är giltigt om dem påföljande kriterierna uppfylls:

- absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200
- A av svagt positiv kontroll > 3% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 3% av A av positiv kontroll
- A av inget serumblankt < 0,350

Kvalitetskontroll av nuvarande partier publiceras på vår hemsida: www.bordier.ch.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9310-07 har ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av alveolär echinokockos och friska eller under minskning humana sera. Det skilda index av ett prov definieras efter subtraktion av det inget serumblankt ämne som:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbans prov}}{\text{Absorbans avskilt serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Echinococcus multilocularis* antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när indexet av det analyserade provet är högre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Echinococcus multilocularis* antigener är kliniskt icke signifikant. Det indikerar att patienten har haft kontakt med parasiten.

Minskning eller negativisering av anti-recEm18 serum-antikropps-nivåer indikerar en fullständig kirurgisk resektion av parasitskador eller en inaktivering av parasiten genom läkemedelsbehandling.

Vid positivt eller tveksamt resultat rekommenderar vi att du utför ett bekräftelsetest (oftast med western blot) om ett sådant test är tillgängligt eller krävs enligt nationella bestämmelser.

Analytiska prestationer:

Analytisk specificitet:

En specificitet på 100% fann man i 12 sera från patienter med andra parasitinfektioner (6 med cystisk echinokockos, 3 med odifferentierad echinokockos och 3 med alternativa diagnoser).

Ingen positiv eller negativ interferens sågs när sera tillsatts suprafysiologiska koncentrationer av hemoglobin, lipider eller bilirubin.

Noggrannhet:

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.
Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0,186	1,260	0,157	1,123
Standardavvikelse (absorbans)	0,022	0,072	0,016	0,074
Variationskoefficient (%)	11,8	5,7	10,0	6,5

Följande prestationer kan inte utvärderas eftersom det inte finns något certifierat referensmaterial för denna analys:

- Analytisk känslighet (gränser för detektion och kvantifiering)
- Noggrannhet
- Sannhet
- Mätområde
- Linjäritet

Kliniska prestationer:

Diagnostisk känslighet:

Parade pre- och postoperativa serumprover från 12 patienter med bekräftad alveolär echinokockos och som hade genomgått en radikal eller icke-radikal operation studerades. Preoperativt hade 9 patienter (75%) ett index >1. Av dessa patienter hade 5 negativa resultat efter operationen. Men hos alla de 12 patienterna sjönk postoperativa Em18-antikropps nivåer och var signifikant lägre än i preoperativa prover.

Serumprover från 25 patienter med bekräftad alveolär echinokockos utan kirurgi men med stabil sjukdom under antiparasitär kemoterapi studerades. 18 (72%) av dem hade ett index >1 (medianindex 6,3). Serumprover från 7 patienter med bekräftad alveolär echinokockos utan kirurgi men med progressiv sjukdom under antiparasitär kemoterapi studerades. 6 (86%) av dem hade ett index >1 (medianindex 13,8).

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 98 % fann man i 99 sera från blodgivare (schweiziska). En specificitet på 94% fann man i 100 sera från patienter på en infektionsenhet (schweizisk).

Positivt och negativt prediktivt värde:

Man fann ett PPV på 80% och ett NPV på 96% i ovannämnda populationer.

Förväntade värden i normala och drabbade populationer:

I en normalpopulation bestående av 99 schweiziska blodgivare och i 100 sera från en schweizisk infektionsenhet är det förväntade indexvärdet 0,33. Data angående det förväntade indexvärdet i en infekterad population finns inte.

Incidenter:

Varje allvarlig incident som inträffar i samband med produkten ska anmälas till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.

Begränsningar:

Diagnos av en infektionssjukdom bör inte upprättas på grundval av ett enda testresultat. En noggrann diagnos bör ta hänsyn till endemisk situation, klinisk historia, symptomatologi, bildbehandling och serologiska data. Hos immunförsvagade patienter och nyfödda är serologiska data av begränsat värde.

Referenser:

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, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

