

# Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Enzimski imunotest za serološko praćenje humane alveolarne ehinokokoze

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



Upute za upotrebu za br. artikla **9310**  
Reg. Br. EZ-a: CH-201708-0010 - UDI-DI: 07640158219317



## Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA namijenjen je za kvantitativno prepoznavanje antitijela protiv Em18 *Echinococcus multilocularis* u ljudskom serumu. Ovaj test namijenjen je poslijeoperativnim i/ili poslijeterapijskim naknadnim pretragama zaraženih bolesnika.

## Pozadina:

Alveolarnu ehinokoku 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 trbuhu, 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 senzibiliziranim rekombinantnim antigenom *Echinococcus multilocularis* Em18. 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):

<b>WELL</b>	9310-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 rekombinantni antigen	96	jažica	
<b>DILB</b>	9310-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml	
<b>WASH</b>	9310-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml	
<b>ENZB</b>	9310-04	Enzimski pufer	50	ml	
<b>STOP</b>	9310-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml	
<b>CONTROL</b>	-	9310-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
<b>CONTROL</b>	-/+	9310-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
<b>CONTROL</b>	+	9310-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
<b>CONJ</b>	9310-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl	
<b>SUBS</b>	9310-10	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 9310-01 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) 9310-02 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) 9310-03 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 9310-06 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 9310-09 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 9310-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9310-04 (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 9310-05.

## 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 <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9310-02	0,1%	0,02%
Otopina 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%	/

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

- Otopina za zaustavljanje 9310-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ima nadražujuć učinak.
- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9310-06 do -08) potječu od kunića.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagente ni različite LOT brojeve kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagente drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagente 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](http://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 apsorpcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorpcije 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 apsorpcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorpcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 3% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 3% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

Kontrole kvalitete trenutačnih LOT brojeva objavljene su na našem web-mjestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9310-07 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.

Smanjenje ili negativizacija razina antitijela u serumu anti-recEm18 označava potpunu kiruršku resekciju parazitske lezije ili inaktivaciju parazita liječenjem lijekovima.

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 100% pronađena je u 12 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija (6 s cističnom ehinokokozom, 3 s nediferenciranom ehinokokozom i 3 s alternativnim dijagnozama).

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
<b>Prosjek (apsorpcija)</b>	0,186	1,260	0,157	1,123
<b>Standardno odstupanje (apsorpcija)</b>	0,022	0,072	0,016	0,074
<b>Koeficijent varijacije (%)</b>	11,8	5,7	10,0	6,5

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:**

Istraživani su upareni pred- i poslijeoperativni uzorci seruma 12 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom koji su imali radikalnu ili neradikalnu operaciju. Predoperativno je 9 bolesnika (75%) imalo indeks >1. Među tim bolesnicima 5 ih je imalo negativne poslijeoperativne rezultate. No u svih 12 bolesnika poslijeoperativne razine antitijela Em18 smanjile su se i bile znatno niže nego u predoperativnim uzorcima.

Istraživani su uzorci seruma 25 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez operacije, no sa stabilnom bolešću, na antiparazitskoj kemoterapiji. Njih 18 (72%) imalo je indeks >1 (srednji indeks 6,3). Istraživani su uzorci seruma 7 bolesnika s potvrđenom alveolarnom ehinokokozom bez operacije, no s progresivnom bolešću, na antiparazitskoj kemoterapiji. Njih 6 (86%) imalo je indeks >1 (srednji indeks 13,8).

**Dijagnostička specifičnost:**

Specifičnost od 98% pronađena je u 99 seruma (švicarskih) darivatelja krvi. Specifičnost od 94% pronađena je u 100 seruma od bolesnika (švicarske) infektološke jedinice.

**Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:**

PPV od 80% i NPV od 96% pronađene su u spomenutim populacijama.

**Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:**

U normalnoj populaciji od 99 švicarskih darivatelja krvi i 100 seruma iz švicarske infektološke jedinice, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,33. Podatci o očekivanoj indeksnoj vrijednosti u pogođenoj populaciji nisu bili dostupni.

**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:**

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**:020239.

**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](http://www.bordier.ch)

