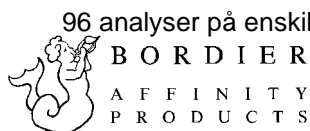


Echinococcus granulosus IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för diagnos av mänskliga echinococcosis



Instruktioner för användning av artikel N° 9350
N° reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01757 - UDI-DI: 07640158219355



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

Avsedd användning:

Bordier *Echinococcus granulosus* IgG ELISA kitet är avsedd för kvantitativ upptäckt av IgG antikroppar mot *Echinococcus granulosus* (och *Echinococcus multilocularis*) i humant serum. Sereologi är ett hjälpmedel mot diagnoser och kan användas som ensam metod för diagnos.

Bakgrund:

Cystisk echinococcos, även känd som hydatid sjukdom, orsakas av larvstadiet av *Echinococcus granulosus*, en lövmask som finns hos hundar. Får, nötkreatur, getter och grisar som mellanliggande värdar har hydatidcystor huvudsakligen i lever och lungor. Människor kan smittas av oavsiktligt intag av lungmaskäggs i förorenad mat eller vatten. Parasitlarverna utvecklas därefter till hydatidcystor, främst i lever och lungor. De huvudsakliga symptomen uppträder när hydatidcystor växer tillräckligt stora för att ge organs dysfunktion plus obehag, smärta, illamående och kräkningar. Diagnosen är baserad på bildteknik, såsom CT-skanningar, ultraljud och MR för att detektera närvaron av väldefinierad cysta/cystor hos en person med exponeringshistoria och ett positivt resultat genom serologisk testning.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på ömtåliga mikrotitrering brunnar sensibiliserade med ***Echinococcus granulosus*** hydatidvätska 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 granulosus* 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	9350 -01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Echinococcus granulosus</i> hydatidvätska antigener	96	brunnar
DILB	9350 -02	Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila	50	ml
WASH	9350 -03	Tvättlösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9350 -04	Enzympuffert	50	ml
STOP	9350 -05	Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350 -06	Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock	200	µl
CONTROL -/+	9350 -07	Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock	200	µl
CONTROL +	9350 -08	Positivt kontrollserum (20 x), rött lock	200	µl
CONJ	9350 -09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock	300	µl
SUBS	9350 -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 spädning 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 9350 -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 9350 -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 9350 -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 9350 -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 9350 -09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: upplös tabletter av fosfatas substrat 9350 -10 i utspädd buffert 9350 -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 9350 -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)	9350 -02	0,1%	0,02%
Tvättlösning (10 x)	9350 -03	0,05%	/
Enzybuffert	9350 -04	0,01%	/
Kontrollsera (20 x)	9350 -06 till -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9350 -09	0,1%	/

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

- Stopplösningen 9350 -05 (0.5 M K₃PO₄) är irriterande.
- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (9350 -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 > 27% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 8% 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 9350 -07 har ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av echinococcosis och friska 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 granulosus*** 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 granulosus*** antigener är kliniskt icke signifikant. Det indikerar att patienten har haft kontakt med parasiten.

En gråzon kan definieras av varje laboratorium enligt patientpopulationen. Vid gränsöverskridande eller tvivelaktiga resultat rekommenderar vi att du upprepar testet igen 2-4 veckor senare med ett nytt prov.

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 87% fann man i 270 sera från patienter med andra parasitinfektioner. Korsreaktivitet uppträder huvudsakligen hos patienter med strongyloidos, filariasis och cysticercos.

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)	0,586	1,416	0,684	1,654
Standardavvikelse (absorbans)	0,027	0,064	0,024	0,079
Variationskoefficient (%)	4,6	4,5	3,5	4,8

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:

En sensitivitet på 95% fann man i 200 sera från patienter med cystisk echinokockos. En sensitivitet på 99% fann man i 67 sera från patienter med alveolär echinokockos. Positiva och tveksamma resultat bör testas igen med *Echinococcus multilocularis*-specifik Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, artikelnr 9300) för att identifiera den infekterande *Echinococcus*-arten.

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 96% fann man i 500 sera från schweiziska blodgivare.

Positivt och negativt prediktivt värde:

För cystisk echinokockos, man fann ett PPV på 91% och ett NPV på 98% i ovannämnda populationer.

För alveolär echinokockos, man fann ett PPV på 78% och ett NPV på 99% 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 0,21. I en infekterad population med 5 sera från patienter med cystisk echinokockos är det förväntade indexvärdet 2,57.

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:

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.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 193-198.

Feckova, 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.



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

