

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner alveolärer Echinokokkose

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9300**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) von humaner alveolärer Echinokokkose (Alveolar Hydatid Disease). Sero-epidemiologische Reihenuntersuchungen von Risikopersonen und Personen nach Erreger-Exposition, post-operative Kontrolle.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 Antigenen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9300-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2-Em18 Antigenen	96	Wells
DILB	9300-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9300-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9300-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9300-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9300-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9300-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9300-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9300-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9300-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9300-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9300-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9300-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9300-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9300-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9300-10 im Puffer 9300-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9300-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9300-02, 9300-03, 9300-04 und 9300-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9300-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9300-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9300-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9300-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9300-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9300-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9300-10 + 9300-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 15 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9300-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit alveolärer Echinokokkose und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9300-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen die *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 -Antigene als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9300-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen die *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 -Antigene als signifikant angesehen.

Sensitivität und Spezifität:

Eine diagnostische Sensitivität von 83% wurde bei einer Gruppe von 151 Patienten mit alveolärer Echinokokkose (*Echinococcus multilocularis*) gefunden. Die meisten Patienten (84%, n=63) mit zystischer Echinokokkose (*Echinococcus granulosus*) waren in diesem Test negativ.

Die Spezifität des Tests wurde mit Seren von Patienten mit anderen Parasitosen untersucht. Dabei wurden negative Ergebnisse in 93% der Fälle von Patienten mit anderen Parasitosen (n=46) gefunden. 267 Seren von Blutspendern (Schweiz) waren zu 98% negativ. Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.647	1.518	0.580	1.407
Standardabweichung (A Wert)	0.033	0.058	0.026	0.064
Variationskoeffizient (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Referenzen:

Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. **36** : 151-160.

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.

Eckert, J., Conraths, F. and Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int. J. Parasitol. **30** : 1283-1294.

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

