

# ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human alveolær ekinokokkose

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9300  
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



## Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af human alveolær ekinokokkose (alveolær hydatid sygdom).  
Seroepidemiologiske studier og undersøgelse af personer i risikozonen, efter eksponering for infektion. Postoperativ kontrol.

## Princip og præsentation:

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Echinococcus multilocularis* Em2-Em18 antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

## Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

<b>WELL</b>	9300-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <b>Echinococcus multilocularis</b> Em2-Em18 antigener	96	brønde
<b>DILB</b>	9300-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
<b>WASH</b>	9300-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9300-04	Enzymbuffer	50	ml
<b>STOP</b>	9300-05	Stopløsning (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b>   -	9300-06	Negativt kontrolserum	200	µl
<b>CONTROL</b>   -/+	9300-07	Svagt positivt serum (afskåret)	200	µl
<b>CONTROL</b>   +	9300-08	Positivt kontrolserum	200	µl
<b>CONJ</b>	9300-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
<b>SUBS</b>	9300-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

## Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

## Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and  $\mu$ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

## Klargøring af reagens inden anvendelse:

**Elisa brønde:** åbn siden af aluminiumstasken 9300-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

**Fortyndingsbuffer:** fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9300-02, 1/10 i destilleret vand.

**Vaskeløsning:** fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9300-03 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10  $\mu$ l kontrolsera 9300-06 til -08 i 190  $\mu$ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

**Sera, som skal testes:** fortynd 10  $\mu$ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9300-09, i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

**Substratløsning:** forvarm enzymbuffer 9300-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9300-10 i ufortyndet buffer 9300-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

**Stopløsning:** anvend reagens 9300-05 ufortyndet.



**Advarsler og sikkerhedshensyn:** Løsninger 9300-02, 9300-03, 9300-04 og 9300-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid ( $N_aN_3$ ). Løsning 9300-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9300-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9300-06 til -8) er fra kaniner.

## Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Fortyndingsbuffer (10 x)</b>	9300-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Vaskeløsning (10 x)</b>	9300-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugat</b>	9300-09 + fortyndingsbuffer	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrolsera</b>	9300-06 til -8 + fortyndingsbuffer	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Sera, som skal testes</b>	Serum + fortyndingsbuffer	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Substratløsning</b>	9300-10 + 9300-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## **Procedure:**

### **Trin 1: Blokering:**

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

### **Trin 2: Inkubation med serumprøver:**

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 3: Inkubation med konjugat:**

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 4: Inkubation med substrat:**

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

### **Trin 5: Måling af absorbanser:**

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

## Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 15 % af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9300-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af alveolær ekinokokkose og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9300-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Echinococcus multilocularis** Em2-Em18 antigener klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af det svagt positive serum 9300-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Echinococcus multilocularis** Em2-Em18 antigener for at være klinisk signifikant.

## Analysens sensitivitet og specificitet:

En diagnostisk sensitivitet på 83% blev fundet i en gruppe på 151 patienter med alveolær ekinokokkose (*Echinococcus multilocularis*). Cirka 84% af cystisk ekinokokkose (n = 63) af cystisk ekinokokkose (*E. granulosus*) er negativ med denne test.

Specificiteten af analysen med sera fra patienter med andre parasitoser blev testet. Resultaterne var negative med 93% af patienterne med andre helminthiasis (n=46). 267 sera fra bloddonorer (schweiziske) var negative på 98%. Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse. Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	0,647	1,518	0,580	1,407
Standardafvigelse (absorbans)	0,033	0,058	0,026	0,064
Variationskoefficient (%)	5,1	3,8	4,5	4,6

## Referencer:

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<sup>plus</sup> 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

