

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Immuno-enzymatische test voor de diagnose van alveolaire Echinococcose bij mensen

96 testen op afscheurbare stripjes bedoeld voor in vitro gebruik

Instructies voor het gebruik van het artikel N° 9300
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01757



Wordt gebruikt voor:

Serologische diagnose (IgG) van alveolaire Echinococcose bij mensen, confirmatie bij verdachte klinische gevallen. Deze test wordt tevens gebruikt bij post-operatieve controle, sero-epidemiologisch onderzoek en risicopersonen.

Principe en presentatie:

De kit bevat het materiaal wat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare stripjes die gesensibiliseerd zijn met het *Echinococcus multilocularis* antigenen Em2-Em18. De aanwezigheid van specifieke anti-lichamen tegenover het parasitaire antigen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - Alkaline fosfatase conjugaat. De gesensibiliseerde strips met de individuele test cupjes maken het mogelijk op een economische wijze kleine hoeveelheden monsters te testen.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

WELL	9300-01	Deelbare ELISA strips gesensibiliseerd met <i>Echinococcus multilocularis</i> antigenen Em2-Em18	96	putjes
DILB	9300-02	Verdunningsvloeistof (10X geconcentreerd)	50	ml
WASH	9300-03	Wasvloeistof (10X geconcentreerd)	50	ml
ENZB	9300-04	Enzyme buffer	50	ml
STOP	9300-05	Stop oplossing (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Negatief controle serum	200	µl
CONTROL -/+	9300-07	Zwak positief controle serum (drempel)	200	µl
CONTROL +	9300-08	Positief controle serum	200	µl
CONJ	9300-09	Proteïne-A Alkaline fosfatase conjugaat	300	µl
SUBS	9300-10	Fosfatase substraat	20	tabletten
		Reservoir voor de reactieven voor 25 ml multi pipetten	1	stuk
		Kader voor ELISA 8 cupjes houder	1	kader

Bewaar condities:

Bewaar de kit tussen 2 en 8° C (transport op kamer temperatuur). De vervaldatum en het productie nummer staat gedrukt op de doos.

Nodig materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (μl en ml), bakjes, tubes voor de verdunning van de sera. Plakband om de cupjes te bedekken gedurende de incubaties. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op 37°C . ELISA lezer afgesteld op 405 nm.

Vorbereiding van de reactieven:

Gesensibiliseerde strips: Open de zijkant van het aluminium zakje en neem de nodige strips er uit. Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8 cupjes houder. Zo nodig markeer de posities van de ongebruikte cupjes met de gebruikte cupjes. Plaats de houder in de lijst in de goede richting. Conserveer de niet gebruikte strips in de goed gesloten verpakking met het silicagel kussentje.

Verdunningsvloeistof: Verdun de geconcentreerde (10x) verdunningsvloeistof 9300-02, 1:10 in gedestilleerd water.

Wasoplossing: Verdun de geconcentreerde (10x) wasoplossing 9300-03, 1:10 in gedestilleerd water. Zo gewent kunt U ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Buffers die fosfaten bevatten moeten vermeden worden om de enzymatische activiteit van de fosfatase niet te verhinderen.

Negatief controle serum, zwak positief (drempel) en positief serum: Verdun 10 microliters controle serum 9300-06 tot 08 in 190 microliters verdunning vloeistof (eind verdunning 1/20).

De te testen sera: Verdun 10 microliters serum in 2.0 ml verdunning vloeistof (1/20).

Protein A-alkaline fosfatase conjugaat: Verdun het conjugaat 9300-09 in TBS-tween 1:51.

Substraat oplossing: Breng de onverdunde enzyme buffer 9300-04 op kamertemperatuur. Voeg het substraat toe in de ELISA cupjes, los de fosfaat-substraat tabletjes (9300-10) op. Eén tabletje in 2.5ml buffer (9300-04). Goed mengen tot dat de tabletjes goed opgelost zijn.

Stopoplossing: Gebruik reagent 9300-05 onverdund.



Waarschuwing: Soluties 9300-02, 9300-03, 9300-04 en 9300-09 bevat respectievelijk 0.1%, 0.01%, 0.05%, 0.01% et 0.1% sodium azide (N_3Na). Oplossing 9300-02 bevat 0.02% merthiolaat. De stopoplossing 9300-05 (0.5 M K_3PO_4) is irriterend.

De negatieve, zwak positieve en positieve sera (9300-06 tot 08) zijn afkomstig van konijnen.

Maak de volgende oplossingen:

			Totaal aantal te gebruiken cupjes			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdunning vloeistof (10 x)	9300-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Wasoplossing (10 x)	9300-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugaat	9300-09 +verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Controle sera	9300-06 tot -08 + verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Te testen sera	Serum + verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substraat	9300-10 + 9300-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Methode:

Stap 1: Blokkage:

Vul de cupjes met verdunning vloeistof.

Incubeer 5 tot 15 minuten op kamer temperatuur (Blokkage).

Verwijder de verdunningsvloeistof door afzuigen of uitkloppen van de strips in de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met serum van de monsters:

Vul het eerste cupje van de eerste strip met 100 microliters verdunningsvloeistof (geen serum, blanco).

Vul de volgende 3 cupjes met 100 microliter verdund negatief, zwak positief (drempel) en positief serum.

Vul de andere cupjes met de te testen verdunde sera (100 microliter).

Bedek de cupjes met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder de sera en was 4x met wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Verdeel 100 microliter Protein A-Alkaline fosfatase conjugaat in elk cupje.

Bedek met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4x met de wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Verdeel 100 microliter substraatoplossing per cupje.

Bedek de cupjes met plakband en incubeer gedurende 30 minuten op 37°C.

Stop de reactie door toevoeging van 100 microliter stopoplossing in elk cupje.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog de onderkant van de strips, verwijder luchtbelletjes en meet de absorptie op 405 nm.

Interpretatie van de resultaten:

De gemeten waarden van de blanco (alleen verdunningsvloeistof, geen serum) wordt van alle andere gemeten waarden afgetrokken. De test wordt betrouwbaar geacht als die aan de volgende criteria voldoet: Absorptie (A) van de positieve controle > 1.200, A van de negatieve controle < 15% van A van de positieve controle en A van de blanco tegen over lucht < 0.350.

De titer van het zwak positief serum 9300-07 (drempel) wordt bepaald om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van alveolaire Echinococcose en normaal menselijk serum optimaal vast te stellen.

Het resultaat is **negatief** wanneer de absorptie van het geanalyseerde monster lager is dan de absorptie van het zwak positief serum 9300-07. In dat geval is de titer van de IgG anti-lichamen tegen ***Echinococcus multilocularis*** antigenen Em2-Em18 niet klinisch significant.

Het resultaat is **positief** wanneer de absorptie van het geteste monster hoger is dan de absorptie van de zwakke positieve controle 9300-07. In dat geval is de titer van de IgG anti-lichamen tegen ***Echinococcus multilocularis*** antigenen Em2-Em18 normalerwijze significant.

Sensibiliteit en specificiteit van de test:

De diagnostische gevoeligheid van 83 % werd geobserveerd bij een groep van 151 patienten met Alveolaire Echinococcosis (*E. multilocularis*). Ongeveer 85% (n=63) van de Cystische Echinococcose (*E. granulosus*) gevallen zijn negatief met deze test.

De specificiteit van de test tegen over andere parasitosen is 93% (n=46). De specificiteit bedraagt 98% getest met sera van Zwitserse bloeddonoren (n=267).

Een interne studie heeft bewezen dat lipemische, icterische of gehemolyseerde sera geen invloed hebben op de resultaten van de test.

De herhaalbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 menselijke sera in 24 cupjes in één enkel experiment. De reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

	Herhaalbaarheid		Reproduceerbaarheid	
	Monster 1	Monster 2	Monster 1	Monster 2
Gemiddeld (absorptie, A)	0.647	1.518	0.580	1.407
Standaardafwijking (absorptie, A)	0.033	0.058	0.026	0.064
Variatie Coëfficiënt (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Referenties:

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
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

