

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

recEm-18

Test immunoenzymatique pour le suivi sérologique de l'échinococcose alvéolaire

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage in vitro

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9310

N° CE: CH-201708-0010



Utilisations prévues du produit:

Suivi sérologique (IgG) post-opératoire et/ou post-thérapeutique de l'échinococcose alvéolaire chez l'homme. Une diminution significative ou même une négativité des anticorps spécifiques anti-Em-18 indique une inactivation du parasite, en particulier lorsqu'il est lié à une négativité de l'imagerie PET.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec l'antigène recombinant Em-18 d'*Echinococcus multilocularis*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis de l'antigène est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	9310-01	Barrettes sécables sensibilisées avec l'antigène Em-18 d' <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	puits
DILB	9310-02	Tampon de dilution (concentré 10 x)	50	ml
WASH	9310-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	9310-05	Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
CONTROL -/+	9310-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
CONTROL +	9310-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
CONJ	9310-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline	300	µl
SUBS	9310-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8° C (transport à température ambiante). La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37° C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9310-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

Tampon de dilution: diluer le tampon de dilution concentré 10 x 9310-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9310-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Sérums de contrôles négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10 μl de chaque sérum de contrôle 9310-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/20).

Sérums à tester: diluer 10 μl de sérum dans 2.0 ml de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/201).

Conjugué protéine A – phosphatase alcaline: diluer le conjugué 9310-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 9310-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9310-10 dans le tampon de l'enzyme 9310-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9310-05 non dilué.



Précautions d'utilisation: Les solutions 9310-02, 9310-03, 9310-04 et 9310-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (N_3N_3). La solution 9310-02 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9310-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9310-06 à -08) proviennent de lapins.

Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampon de dilution (10 x)	9310-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavage (10 x)	9310-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugué	9310-09 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sérums de contrôles	9310-06 à -08 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sérums à tester	Sérum + tampon de dilution	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solution de substrat	9310-10 + 9310-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Méthode:

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution tampon de dilution.

Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes en dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc en absence de sérum).

Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).

Remplir les autres puits avec les sérums à tester dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué protéine A - phosphatase dilué dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc en absence de sérum de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis: DO contrôle positif > 1.200, DO contrôle négatif < 5 % du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9310-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'échinococcose alvéolaire et les sérums de sujets sains ou en rémission.

L'index cut off de chaque échantillon est défini, après soustraction du blanc en absence de sérum, par la formule suivante:

$$\text{Index} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO sérum seuil}}$$

Le résultat est **négatif** lorsque l'index du sérum à tester est inférieur à **1.0**. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre l'antigène Em-18 d'*Echinococcus multilocularis* n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque l'index du sérum à tester est supérieur à **1.0**. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre l'antigène Em-18 d'*Echinococcus multilocularis* est considérée comme cliniquement significative.

La diminution ou la négativité des anticorps sériques anti-recEm18 indique une résection chirurgicale complète de la lésion du parasite ou une inactivation du parasite par traitement médicamenteux.

Sensibilité et spécificité du test:

Des paires de sérums pré- et post-chirurgie de 12 patients présentant une échinococcose alvéolaire confirmée et ayant subi une chirurgie radicale ou non-radical ont été étudiés. Pré-chirurgie, 9 patients (75%) avaient un index >1. Parmi eux, 5 ont un résultat post-chirurgie négatif. Mais pour les 12 patients, le taux d'anticorps anti-Em18 post-chirurgie a chuté et était significativement inférieur au taux dans les sérums pré-chirurgie.

Des sérums de 25 patients présentant une échinococcose alvéolaire confirmée sans chirurgie mais avec une maladie stable sous chimiothérapie antiparasitaire ont été étudiés. 18 (72%) d'entre eux avaient un index >1 (index médian 6.3).

Des sérums de 7 patients présentant une échinococcose alvéolaire confirmée sans chirurgie mais avec une maladie progressive sous chimiothérapie antiparasitaire ont été étudiés. 6 (86%) avaient un index >1 (index médian 13,8).

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.186	1.260	0.157	1.123
Ecart-type (densité optique)	0.022	0.072	0.016	0.074
Coefficient de variation (%)	11.8	5.7	10.0	6.5

Références:

Ammann, R.W., Rebber, E.C., Gottstein, B., Grimm, F. Eckert, J., Renner, E.L. (2004) Immunosurveillance of alveolar echinococcosis by specific humoral and cellular immune tests: long-term analysis of the Swiss chemotherapy trial (1976-2001). (2004) J. Hepatol. **41** : 551-9.

Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y. Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., Nakao, M., Ito, A., Kern, P. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. (2009) Am. J. Trop. Med. Hyg. **80** : 792-7.

Ishikawa, Y., Sako, Y. Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., Ohsaki, Y., Miyokawa, N., Nakao, M., Nakaya, K., Ito, A. (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**.



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

