

ECHINOCOCCUS MULTILOCCULARIS

recEm-18

Enzymimmunoassay zur Verlaufskontrolle humanen alveolärer Echinokokkose

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9310**
EC reg. N°: CH-201708-0010



Anwendungsgebiet:

Postoperative und / oder posttherapeutische serologische Verlaufskontrolle (IgG) der humanen Alveolar-Echinokokkose. Eine signifikante Abnahme oder gar eine serologische Negativierung von anti-Em18-Antikörpern geht einher mit einer Inaktivierung des Parasiten, insbesondere in Verbindung mit einer Negativierung von bildgebenden PET-Ergebnissen.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit rekombinantem *Echinococcus multilocularis* Em18-Antigen 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	9310-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Echinococcus multilocularis</i> Em18 Antigen	96	Wells
DILB	9310-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9310-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9310-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9310-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9310-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9310-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9310-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9310-10	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 (9310-01) 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 9310-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9310-03, 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 9310-06 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 9310-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9310-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9310-10 im Puffer 9310-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9310-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9310-02, 9310-03, 9310-04 und 9310-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (NaN_3). Lösung 9310-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9310-05 (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)	9310-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9310-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9310-09 + Verdünnungspuffer	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9310-06 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	9310-10 + 9310-04	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 < 5 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9310-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von klinisch dokumentierten Fällen von alveolärer Echinokokkose und normalen oder unter Remissionspersonen humanen Seren.

Der Cut-off einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **1.0** ist. In diesem Fall, ist die IgG-Antikörperkonzentration gegen **Echinococcus multilocularis** Em18 -Antigen nicht aussagekräftig.

Das Ergebnis ist **positive**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1.0** ist. In diesem Fall, ist die IgG-Antikörperkonzentration gegen **Echinococcus multilocularis** Em18 -Antigen normalerweise aussagekräftig.

Eine Abnahme oder eine serologische Negativierung von anti-Em18-Antikörpern zeigt eine vollständige chirurgische Resektion der Parasitenläsion oder eine Inaktivierung des Parasiten durch eine medikamentöse Behandlung an.

Sensitivität und Spezifität:

Es wurden paarweise prä- und post-operative Serumproben von 12 Patienten mit bestätigter alveolärer Echinokokkose untersucht, die sich einem radikalen oder nicht-radikalen chirurgischen Eingriff unterzogen haben. Vor der Operation hatten 9 Patienten (75%) einen Index >1 und davon zeigten dann post-operativ 5 Patienten ein negatives serologisches Resultat. Darüber hinaus ging post-operativ bei allen 12 Patienten die Serum-anti-EM18 Antikörperkonzentrationen signifikant zurück.

Des weiteren wurden Serumproben von 25 Patienten mit bestätigter alveolärer Echinokokkose ohne Operation, aber stabilem Krankheitsverlauf unter antiparasitärer Chemotherapie untersucht. 18 (72%) dieser Patienten wiesen einen Index >1 (Median-Index 6,3) auf.

Serumproben von 7 Patienten ohne Operation und einem progressiven Krankheitsverlauf unter Chemotherapie wurden ebenfalls analysiert. 6 (86%) dieser Patienten hatten im Test einen Index >1 (Median-Index 13,8).

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	
Durchschnitt (A Wert)	0.186	1.260	0.157	1.123
Standardabweichung (A Wert)	0.022	0.072	0.016	0.074
Variationskoeffizient (%)	11.8	5.7	10.0	6.5

Referenzen:

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

