

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Echinokokkose

96 Tests in einzelnen Wells



Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. 9350

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757

Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) von humaner zystischer Echinokokkose (ausgelöst durch *Echinococcus granulosus*).

Dieser Test kann ebenfalls zur serologischen Diagnose von humaner alveolärer Echinokokkose (ausgelöst durch *Echinococcus multilocularis*) verwendet werden. Positive und fragliche Fälle sollten mit dem *Echinococcus multilocularis*-spezifischen Em2-Em18 (Bordier Affinity Products, Artikel Nr. 9300) wiederholt werden, um die ursächliche *Echinococcus*-Spezies herauszufinden.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Echinococcus granulosus*-Antigen aus Zysten-Flüssigkeit 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	9350-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Echinococcus granulosus</i> -Antigen (aus Zystenflüssigkeit)	96	Wells
DILB	9350-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9350-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9350-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9350-05	Stopp Lösung (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9350-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9350-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9350-10	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 (9350-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wiederverschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9350-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9350-03 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 9350-06 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 9350-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9350-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9350-10 im Puffer 9350-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9350-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9350-02, 9350-03, 9350-04 und 9350-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (NaN_3). Lösung 9350-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9350-05 (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)	9350-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9350-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9350-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9350-06 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	9350-10 + 9350-04	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 < 12% von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9350-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Zystischer 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 9350-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das ***Echinococcus granulosus***-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9350-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das ***Echinococcus granulosus***-Antigen als signifikant angesehen.

Sensitivität und Spezifität:

Eine diagnostische Sensitivität von 96% wurde bei einer Gruppe von 24 Patienten mit zystischer Echinokokkose (*Echinococcus granulosus*) gefunden. Die meisten Patienten (90%) mit alveolärer Echinokokkose (*Echinococcus multilocularis*) waren ebenfalls in diesem Test positiv.

Die Spezifität des Tests wurde mit Seren von Patienten mit anderen Parasitosen untersucht. Dabei wurden negative Ergebnisse in 82% der Fälle von Patienten mit Helminthosen (n=51) und in 83% der Fälle mit Protozoen (n=23) gefunden. 150 Seren von Blutspendern (Schweiz) waren zu 97% negativ. Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Innerhalb des üblichen Probenkollektivs, das in einem Europäischen Labor untersucht wird, wurde ein negativer prädiktiver Wert von nahezu 100% gefunden. Im Gegensatz dazu muss ein positives Ergebnis in jedem Fall mit höher spezifischen Tests (Em2-Em18 und die Suche nach anti-8 Kd-Antikörpern mittels Immunoblot) bestätigt werden.

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)	0.586	1.416	0.684	1.654
Standardabweichung (A Wert)	0.027	0.064	0.024	0.079
Variationskoeffizient (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Referenzen:

Gottstein, B. (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. **5** : 248-261.

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.

Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B. (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **60**: 193-198.



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

