

# ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

## Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Echinokokkose

96 Tests in einzelnen Wells

Technische Daten und 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<sup>plus</sup>-ELISA (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 anti-human-IgG/Alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

### Kitbestandteile (96 Tests):

9350-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <b><i>Echinococcus granulosus</i></b> -Antigen (aus Zystenflüssigkeit)	96	Wells
9350-02	TBS-Tween Puffer (10 x) Konzentrat	50	ml
9350-03	Washingpuffer (10 x) Konzentrate	50	ml
9350-04	Enzymepuffer	50	ml
9350-05	Stopp Lösung (0,5 M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
9350-06	Negatives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9350-07	Cut off/ Schwach positives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9350-08	Positives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9350-09	Anti-human IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat	300	µl
9350-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
9350-11	Multipipetten- Reservoir 25 ml	1	Stück
9350-12	Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück
9350-13	Qualitätskontrollblatt und Gebrauchsanweisung		

### Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C. Das Verfallsdatum der Testpackung ist auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

## Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und  $\mu$ l), 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 (Nr. 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.

**TBS-Tween Konzentrat (TBS-Tw 10x):** Lösung mit TBS-Tw (10 x) Konzentrat Nr.9350-02 (1/10) und destilliertem Wasser ansetzen.

**Waschlösung:** Waschkonzentrat (10 x) Nr. 9350-03 (1/10), mit destilliertem Wasser verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

**Anti-human IgG-Alkalische Phosphatase Konjugat:** Das Konzentrat N° 9350-09 wird mit TBS-Tw Lösung, 1:51 verdünnt.

**Negative, schwach-positive/(Cut-off) und positive Kontroll-Seren:** 10  $\mu$ l Kontrollseren N° 9350-06 – 9350-08 mit 190  $\mu$ l TBS-Tw Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

**Patientenseren:** 10  $\mu$ l Patientenserum mit 2,0 ml TBS-Tw Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

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

**Stopp-Lösung:** Reagenz N° 9350-05, gebrauchsfertig.

Warnung: Die  $K_3PO_4$  Lösung kann zu Hautreizungen führen. Vorsichtig damit umgehen.

**Warnung :** Die Lösungen 9350-02, 9350-03, und 9350-09 enthalten 0,1% Natriumazid ( $Na_3N_3$ ), die Lösung 9350-04 0,01%. Lösung 9300-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung, 9350-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) ist reizend.

Die negativen, schwach positiven/(Cut-off) und positiven Kontrollseren (N° 9350-06 ,9350-07, 9350-08) erwiesen sich bei der Prüfung auf anti-HIV 1, anti-HIV 2 und auf anti-HVC Antikörper und HBs Antigen als negativ.

## Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>TBS-Tween (10 x)</b>	Nr.9350-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Waschpuffer (10 x)</b>	Nr.9350-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugat</b>	Nr.9350-09 + TBS-Tw	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrollen</b>	Nr.9350-06 bis 08 +TBS-Tw	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Patientenserum</b>	Serum +TBS-Tw	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Substrat</b>	N°9350-10 + N°9350-04	Tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## Durchführung:

### Schritt 1: Blocking:

Die Wells komplett mit TBS-Tween (TBS-Tw) füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking ).

TBS-Tw absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

### Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl TBS-Tw 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 anti-human IgG/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.

## Auswertung:

Von allen Meßergebnissen den Reagenzien-Blankwert abziehen. Der Testansatz ist gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1,200, A der Negativ-Kontrolle < 12% von A der Positiv-Kontrolle, A des Blank-Wertes < 0,350

Die Antikörper-Konzentration des Cut-off Serums N°7 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. In diesem Fall wird die 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 Cutt-off Serums. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Echinococcus granulosus*-Antigen als signifikant angesehen.

## Sensitivität und Spezifität des Tests:

Bei einer Gruppe von 200 Patienten mit zystischer Echinokokkose (*Echinococcus granulosus*) wurde eine diagnostische Sensitivität von 95% gefunden. Mehr als 95% der Patienten mit alveolärer Echinokokkose (*Echinococcus multilocularis*) waren ebenfalls in diesem Test positiv. Im Falle von positiven Ergebnissen wird die gleichzeitige Untersuchung der Proben im Em2<sup>plus</sup>-ELISA (Art. Nr. 9300) empfohlen sowie die Suche nach anti-8 Kd-Antikörpern mittels Immunoblot.

200 Seren von Patienten mit anderen Parasitosen (meistens Helminthen) wurden untersucht. Dabei wurden negative Ergebnisse in 68% der Fälle von Patienten mit tropischen Helminthosen (Filariose, Schistosomose, Strongyloidose) gefunden, in 88% der Fälle mit autochthonen Helminthosen (Askaridiose, Fasziole, Toxokarose und Trichinose) und in 98% der Fälle mit Protozoen (Amöbiose, Leishmaniose, Malaria und Toxoplasmose). Im Gegensatz dazu waren 73% der Fälle mit Cysticerose positiv (11 Seren). 6% von Krebspatienten waren positiv in diesem Test. 500 Seren von Blutspendern (Schweiz) waren zu 98% 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<sup>plus</sup>-ELISA und die Suche nach anti-8 Kd-Antikörpern mittels Immunoblot) bestätigt werden.

## 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<sup>plus</sup> 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/](http://www.bordier.ch/)