

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner alveolärer Echinokokkose

96 Tests in einzelnen Wells

Technische Daten und Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. 9300,

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757

Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) von humaner alveolärer Echinokokkose (Alveolar Hydatid Disease). Sero-epidemiologische Reihenuntersuchungen von Risikopersonen und Personen nach Erreger-Exposition, post-operative Kontrolle.

Testprinzip :

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Echinococcus multilocularis* Em2^{plus} Antigen 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):

9300-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Echinococcus multilocularis</i> Em2 ^{plus} Antigen	96	Wells
9300-02	TBS-Tween-Puffer (10 x) Konzentrat	50	ml
9300-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
9300-04	Enzympuffer	50	ml
9300-05	Stopp-Lösung (0,5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
9300-06	Negatives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9300-07	Cut off/ Schwach positives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9300-08	Positives Kontroll-Serum (human)	200	µl
9300-09	Anti-human IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
9300-010	Phosphatase-Substrate	20	Tabletten
9300-011	Multipetten-Reservoir, 25 ml	1	Stück
9300-012	Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück
9300-013	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 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 (N° 9300-01) 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.

TBS-Tween Konzentrat (TBS-Tw (10x): Lösung mit TBS-Tw (10 x) Konzentrat N° 9300-02 und destilliertem Wasser ansetzen.

Waschlösung: Waschkonzentrat (10 x) N° 9300-03, 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° 9300-09 wird mit TBS-Tw Lösung, 1:51 verdünnt.

Negative, schwach-positive/(Cut-off) und positive Kontroll-Seren: 10 µl Kontrollseren N° 9300-06 – 9300-08 mit 190 µl TBS-Tw Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 µl Patientenserum mit 2,0 ml TBS-Tw Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Substrat-Lösung: Den Enzym-Puffer N° 9300-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substratabletten N° 9300-10 im Puffer N° 9300-04 auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz N° 9300-05, gebrauchsfertig.

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

Warnung : Die Lösungen 9300-02, 9300-03, und 9300-09 enthalten 0,1% Natriumazid (NaN_3), die Lösung 9300-04 0,01%. Lösung 9300-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung, 9300-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die negativen, schwach positiven/(Cut-off) und positiven Kontrollseren (N° 9300-06 ,9300-07, 9300-08) 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
TBS-Tween (10 x)	N°9300-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	N°9300-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	N°9300-09 + TBS-Tw	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	N° 9300-06 bis 08 +TBS-Tw	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum +TBS-Tw	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	N°9300-10 + N°9300-04	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 > 1.000, A der Negativ-Kontrolle < 10% von A der Positiv-Kontrolle, A des Blank-Wertes < 0,350

Die Antikörper-Konzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit alveolärer Echinokokkose und gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Eine Probe, deren Absorption niedriger als die der schwach positiven Kontrolle (Cut off) ist, enthält keine signifikanten Antikörperspiegel gegen das *Echinococcus multilocularis* Em2^{plus} - Antigen, sie gilt daher als serologisch **negativ**.

Eine Probe, deren Absorption höher als die der schwach positiven Kontrolle (Cut off) ist, gilt als serologisch **positiv**.

Sensitivität und Spezifität:

Die diagnostische Sensitivität des Tests für humane alveoläre Echinokokkose ist 97%. Die Spezifität bezüglich Nicht-Echinokokken-Parasiten ist 98,9%. Ungefähr 25% der Proben von Patienten mit zystischer Echinokokkose (*E. granulosus*) weisen für das Em2^{plus} Antigen eine höhere Absorption auf, als die des schwach-positiven Kontrollserums.

Interne Studien zeigten, daß hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluß auf die Ergebnisse des Tests haben.

Referenzen:

Gottstein, B. (1985) Purification and characterization of a specific antigen from *Echinococcus multilocularis*. Parasite immunol. **7** : 201-212.

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.

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