

ECP ELISA

ELISA zur quantitativen Bestimmung des Eosinophilen Kationischen Proteins (ECP) in humanem Serum

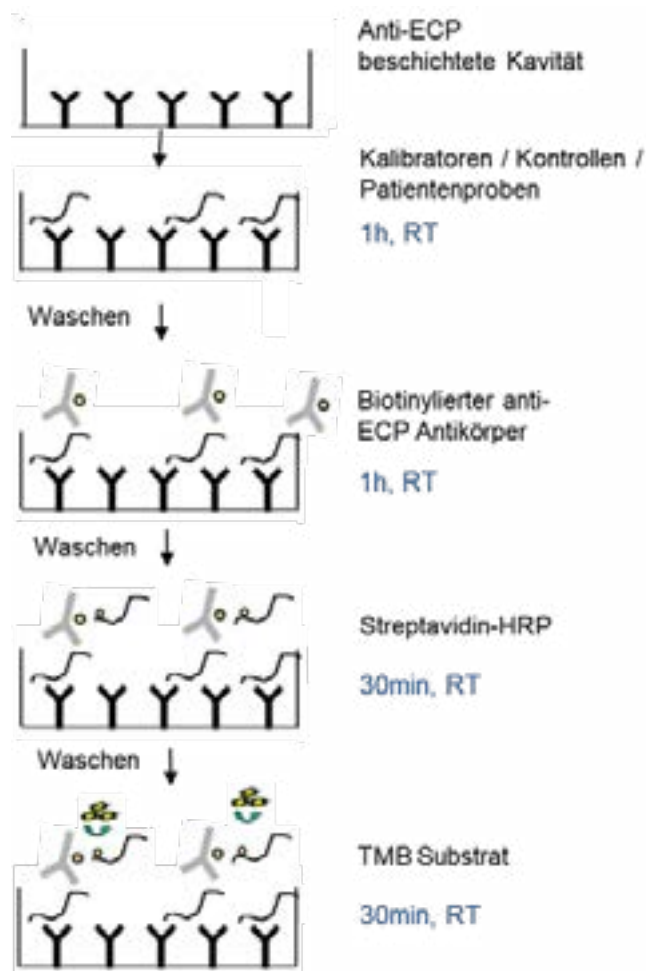
Eosinophile Granulozyten sind an verschiedenen Entzündungsprozessen aktiv beteiligt. Erhöhte Anteile an Eosinophilen werden u.a. bei allergischen, parasitären, aber auch rheumatischen Erkrankungen gefunden. Die bedeutendste Eigenschaft der Eosinophilen sind ihre großen Granula. Diese enthalten jeweils vier wesentliche Proteine, wovon das „eosinophil cationic protein“ (ECP, Eosinophiles Kationisches Protein) das bekannteste ist. Erhöhte ECP-Konzentrationen werden bei atopischen Erkrankungen wie z.B. allergisches Asthma und allergische Rhinitis, gelegentlich aber auch bei anderen Erkrankungen wie bakterielle Sinusitis nachgewiesen. Die Höhe des ECP-Spiegels im Serum korreliert mit der Krankheitsaktivität bzw. dem Schweregrad von Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Damit dient dieser Laborparameter der Objektivierung und der Therapieüberwachung bei Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis. Der ECP ELISA zur Konzentrationsbestimmung von ECP in humanem Serum wird als „Sandwich ELISA“ in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu sind die einzelnen Kavitäten mit Anti-ECP-Antikörper beschichtet, wodurch in einem ersten Inkubationsschritt das ECP aus der Patientenprobe gebunden wird. Überschüssige Serumkomponenten werden durch Waschen entfernt. Im nächsten Reaktionsschritt wird ein biotinylierter Anti-ECP-Antikörper in den Kavitäten der Mikrotiterplatten inkubiert. Nach einem erneuten Waschzyklus erfolgt die Detektion über ein Streptavidin/Peroxidase (HRP)-Konjugat unter Bildung festphasengebundener ECP / biotinylierter Anti-ECP-Antikörper / Konjugat-Komplexe. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgt die Zugabe des HRP-Substrates Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), was zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt.

ECP Spezifikationen

- ▲ Testdauer ≈ 3h (60min/ 60min/ 30min/ 30min)
- ▲ 20µL Serum oder Plasma pro Bestimmung
- ▲ Detektionssystem: HRP/TMB
- ▲ 6-Punkt Kalibrierung
(0; 2,0; 6,0; 20; 60; 200 ng/mL)
- ▲ Großer Messbereich (bis 200 ng/mL)
- ▲ Detektionslimit 0,5 ng/mL

ECP REF 25070 96

Nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mittels Säure schlägt die Farbe nach gelb um. Anschließend muss die optische Dichte (OD) des farbigen Reaktionsproduktes bei 450 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen werden. Anhand der ODs der Standards wird eine Standardkurve generiert, mit deren Hilfe die ECP-Konzentrationen der unbekannten Proben ermittelt werden können.



Zugabe der Stopplösung und Messung der optischen Dichte bei 450nm

Abbildung 1
Prinzip des ECP Test

Leistungsmerkmale

Die Intra-Assay, Inter-Assay und Lot-to-Lot Variationen wurden innerhalb der folgenden Spezifikationen gefunden:

Intra-Assay Variation	< 10%
Inter-Assay Variation	< 15%
Inter-Batch Variation	< 20%

Bei gesunden Personen liegt die ECP-Konzentration bei ca. 1-15 ng/mL. Jede Person weist hierbei eine eigene Basalkonzentration auf, die normalerweise im zeitlichen Verlauf gleich bleibt. Eine erhöhte ECP-Konzentration, ca. >10 ng/mL, weist auf einen allergischen Entzündungsprozess, wie z.B. Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis, hin.

Es ist eine Linearität bis zu 150 ng/mL für den ECP ELISA gezeigt. Im Bereich > 150 ng/mL sind die Messwerte nicht zwingend linear, da die Standardkurve sich in diesem Bereich in der Sättigung befindet.

Die Ergebnisse des Testes sollten immer im Zusammenhang mit der klinischen Situation des Patienten und seiner Anamnese beurteilt werden.

In einer Evaluierung wurden eine Sensitivität von 100% und Spezifität von 88% (verglichen zu einem kommerziell verfügbaren ECP ELISA) bestimmt (Poster DGA-KI, 2020).

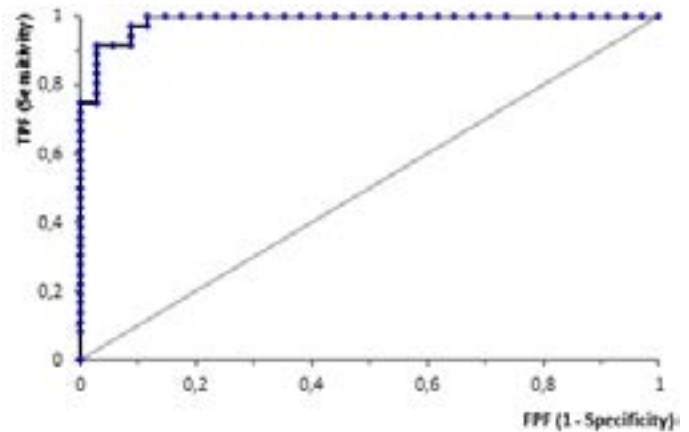


Abbildung 2: ROC Analyse für den ECP ELISA von Dr. Fooke Laboratorien GmbH vs. kommerziell verfügbaren ECP ELISA mit n=70 Ergebnissen

Die Spearman Korrelation zwischen dem ECP ELISA von Dr. Fooke Laboratorien GmbH und einem kommerziell verfügbaren ECP ELISA zeigt einen Korrelationskoeffizient von 0,98 (CI 0,97-0,99).

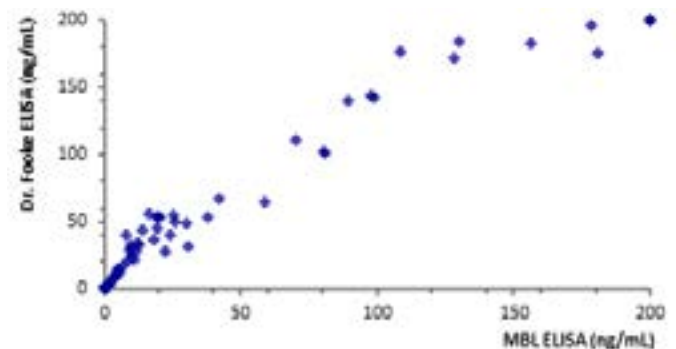


Abbildung 3

Spearman Korrelation zwischen dem ECP ELISA von Dr. Fooke Laboratorien GmbH und einem kommerziell verfügbaren ECP ELISA mit n=70 Ergebnissen.

Literatur

1. Bystrom J, Amin K, & Bishop-Bailey D (2011) Analysing the eosinophil cationic protein--a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir Res* 12:10.
2. Niimi A & Matsumoto H (1999) Serum measurement of eosinophil cationic protein in the management of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 5(2):111-117.
3. Escudero Pastor A & Hernandez Garcia J (1993) [Diagnostic performance of eosinophil protein quantification. Review]. *Allergol Immunopathol (Madr)* 21(6):233-240.
4. Czerwionka-Szaflarska M & Gasiorowska J (2006) [Eosinophil cationic protein as a marker of eosinophil activity]. *Przegl Lek* 63(7):579-582.
5. Kapp A (1993) [The role of eosinophilic granulocytes for the pathogenesis of atopic dermatitis /neurodermatitis. Eosinophilic products as markers of disease activity]. *Hautarzt* 44(7):432-436.

DR FOOKE