

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Test immunoenzimatico per la diagnostica dell' amebiasi invasiva umana

96 test su pozzetti separabili destinate ad uso diagnostico in vitro e per uso professionale di laboratorio



Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9550
N° CE: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Uso previsto del prodotto:

Il kit *Entamoeba histolytica* IgG ELISA della Bordier è finalizzato alla rilevazione quantitativa degli anticorpi IgG nei confronti della *Entamoeba histolytica* nel siero umano. La sierologia è un aiuto per la diagnosi e non può essere utilizzata come l'unico metodo di diagnosi.

Background:

L'amebiasi è causata dal protozoo *Entamoeba histolytica*, un'ameba patogena. Gli esseri umani possono essere infettati dall'ingestione involontaria di cisti amebiche presenti nel cibo o acqua contaminata. I sintomi più frequenti si manifestano durante la fase intestinale (dolore di stomaco e diarrea). Tuttavia in alcuni casi il parassita diventa invasivo al di fuori dell'intestino e portare così alla formazione di un ascesso principalmente nel fegato. I pazienti presenteranno principalmente febbre e dolori addominali. La diagnosi di amebiasi extra intestinale si basa su tecniche ad immagine come le scansioni CT, le ecografie e la MRI per rilevare lesioni epatiche e risultato positivo dell'esame sierologico. La sierologia viene anche utilizzata per escludere l'amebiasi nel quadro di diagnosi differenziali con altre malattie del fegato.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene tutto il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti fragili sensibilizzati con antigeni solubili trophozoite di *Entamoeba histolytica*. Gli anticorpi specifici nel campione si legheranno a questi antigeni ed il lavaggio eliminerà gli anticorpi non specifici. La presenza di anticorpi specifici parassitari è rilevata mediante un coniugato di fosfatasi alcalina di proteina A. Una seconda fase di lavaggio rimuoverà il coniugato non legato. La rilevazione di anticorpi non legati viene fatta mediante l'aggiunta di substrato pNPP che diventa giallo con la presenza di fosfatasi alcalina. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità di anticorpi specifici di *Entamoeba histolytica* nel campione. Viene aggiunto fosfato di potassio per fermare la reazione. L'assorbimento a nm 405 viene letto utilizzando un lettore di piastra ELISA. Il test può essere eseguito con sistemi automatici, ma ciò verrà convalidato dall'utilizzatore.

Materiale contenuto nel kit (96 test):

WELL	9550-01	Pozzetti sensibilizzati con gli antigeni solubili trophozoite di <i>Entamoeba histolytica</i>	96	pozzetti
DILB	9550-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x) colorato porpora	50	ml
WASH	9550-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Tampone dell'enzima	50	ml
STOP	9550-05	Soluzione d'arresto (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Siero di controllo negative (20 x), involucro verde	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Siero di controllo debolmente positivo (soglia, 20 x), involucro giallo	200	µl
CONTROL +	9550-08	Siero di controllo positivo (20 x) involucro rosso	200	µl
CONJ	9550-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina (50x) involucro porpora	300	µl
SUBS	9550-10	Substrato della fosfatasi (para nitrofenil fosfato)	20	Compresse
		Riserva di reattivi per multipipette, 25 ml	1	Pezzo
		Quadro di sostegno per il contenitore dei pozzetti	1	Quadro

Conservazione:

Conservare il kit tra 2-8°C (trasporto a temperatura ambiente), evitare l'esposizione per lungo periodo dei componenti alla luce diretta. La data di scadenza e il numero del lotto del kit sono stampati sul lato della scatola. Dopo l'apertura iniziale, tutti i reagenti sono stabili sino alla data di scadenza se conservati tra 2-8°C.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (µl e ml). Recipienti. Provette. Nastro adesivo per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C. Lettore ELISA tarato a 405 nm. Attrezzatura automatica o manuale per il risciacquo dei pozzetti. Miscelatore a vortice. Timer.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente e miscelare prima dell'uso.

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9550-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti (uno in bianco, tre per i controlli, più il numero di campioni). Mettere i pozzetti sensibilizzati in un supporto a 8. Se necessario, completare le posizioni non utilizzate del supporto con dei pozzetti già usati. Mettere il supporto in un quadro rispettando il suo orientamento. Conservare le pozzette non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9550-02, 1/10 in acqua distillata. Questo viene usato per la diluizione dei controlli, dei campioni e del coniugato. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 2-8°C.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9550-03, 1/10 in acqua distillata. Se volete utilizzare la vostra soluzione di lavaggio, evitate i tamponi che contengono fosfato e che potrebbero inibire successivamente l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina. La soluzione diluita per il lavaggio è stabile per 2 mesi a 2-8°C.

Sieri di controllo: diluire 10 µl di ogni siero di controllo 9550-06 a -08 in 190 µl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20). I sieri di controllo diluiti sono stabili per 2 mesi a 2-8°C.

Coniugato: diluire il coniugato 9550-09, nella soluzione tampone di diluizione (soluzione finale 1/50). Diluire il coniugato nel giorno del test. Non conservare il coniugato diluito.

Soluzione di substrato: disciogliere delle compresse di substrato fosfatase 9550-10 nel tampone dell'enzima 9550-04 non diluito (una compressa in 2,5 ml di tampone). Sottoporre a vortice fino al completo discioglimento della compressa. Diluire il substrato il giorno del test e proteggere la provetta dalla luce diretta. Le compresse e le soluzioni substrato devono essere incolori o avere solo una lieve colorazione giallastra. Se una compressa o una soluzione substrato si colora di giallo, può essere stata parzialmente idrolizzata e deve essere scartata. Non conservare la soluzione substrato.

Soluzione d'arresto: utilizzare il reagente 9550-05 non diluito.

Raccolta di campioni e preparazione:

Utilizzare siero umano. Il siero deve essere conservato a 2-8°C se analizzato entro qualche giorno, altrimenti conservatelo a -20°C o di meno. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Sottoporre a vortice i campioni e diluire 1/201 in soluzione tampone diluita (ad esempio campione da 5 µl in 1,0 ml).

Avvertimenti e precauzioni:

I componenti tossici vengono rilevati nella seguente concentrazione:

Componente	Riferimento	Azoturo di sodio (Na ₂ N ₃)	Mertiolato
Tampone diluizione (10 x)	9550-02	0,1 %	0,02%
Soluzione lavaggio (10 x)	9550-03	0,05 %	/
Tampone enzimatico	9550-04	0,01 %	/
Sieri di controllo (20 x)	9550-06 a -08	0,1 %	0,02%
Coniugato (50 x)	9550-09	0,1 %	/

Tutte le concentrazioni utilizzate, azoturo di sodio e il mertiolato non hanno alcun rischio tossicologico al contatto con la pelle e con le mucose.

- La soluzione d'arresto 9550-05 (0.5 M K₃PO₄) è irritante.
- I sieri di controllo negativi, debolmente positivi, positivi (da 9550-06 a -08) provengono dai conigli.
- Trattare tutti i reagenti ed i campioni come materiale potenzialmente infettivo.
- Non scambiare reagenti di lotti diversi di kit ELISA della Bordier.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori con reagenti di questo kit.
- Non utilizzare reagenti dopo la loro data di scadenza.
- Chiudere le fiale di reagente subito dopo l'uso ermeticamente e non scambiare i tappi a vite per evitare la contaminazione.
- Usare pipette separate e pulite per ogni campione.
- Non riutilizzare pozzetti.
- Evitare il deterioramento dei pozzetti per azione meccanica (punte/coni, ugelli).
- Le descrizioni dei simboli utilizzati sulle etichette sono disponibili sul sito web www.bordier.ch.

Considerazioni sullo smaltimento:

Tutto il materiale utilizzato per questo test vengono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Fare riferimento alle leggi regionali e nazionali per quanto riguarda le regole e le disposizioni sui rifiuti pericolosi.

Procedura:

Durante lo svolgimento del test, evitare la formazione di bolle nei pozzetti.

Tappa 1: Bloccaggio:

Riempire completamente i pozzetti con la soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti alla temperatura ambiente (bloccaggio dei pozzetti).

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le pozzetti sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con campioni:

Riempire il primo pozzetto della prima astina con 100 µl di tampone di diluizione (bianco senza siero).

Riempire i tre pozzetti seguenti rispettivamente con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo). Per test con più di 25 campioni, suggeriamo di riempire gli ultimi tre pozzetti con sieri di controllo come duplicato.

Riempire gli altri pozzetti con i sieri diluiti (100 µl ciascuno).

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37°C.

Eliminare i sieri e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 3: Incubazione con il coniugato:

Distribuire 100 µl del coniugato diluito in ogni pozzetto (compreso il "bianco" senza siero). Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37°C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con 250 µl di soluzione di lavaggio.

Tappa 4: Incubazione con il substrato:

Distribuire 100 µl della soluzione di substrato in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37°C.

Arrestare la reazione aggiungendo a ogni pozzetto 100 µl della soluzione d'arresto.

Tappa 5: Misura della densità ottica:

Asciugare sotto i pozzetti, eliminare le eventuali bolle d'aria e misurare la densità ottica (Assorbimento) alla lunghezza d'onda di 405 nm entro la prima ora dopo l'aggiunta della soluzione d'arresto.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del bianco senza siero in assenza di siero da tutti gli altri valori. Se applicabile calcolare i valori dell'assorbimento medio dei sieri di controllo duplicati. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti:

- Assorbimento (A) del controllo positivo > 1,200
- A del controllo positivo debole > 12% di A del controllo positivo
- A del controllo negativo < 12% di A del controllo positivo
- A del bianco senza siero < 0,350

I controlli di qualità dei lotti correnti vengono pubblicati sul nostro sito: www.bordier.ch.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9550-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di amebiasi e i sieri di soggetti sani.

L'indice di soglia di un campione si intende da sottrazione del bianco senza siero come:

$$\text{Indice} = \frac{\text{Campione d'assorbimento}}{\text{Assorbimento siero soglia}}$$

Il risultato è **negativo** quando l'indice del campione analizzato è inferiore a 1.0. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni di *Entamoeba histolytica* non è clinicamente significativa.

Il risultato è **positivo** quando l'indice del campione analizzato è superiore a 1.0. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro degli antigeni di *Entamoeba histolytica* è considerata clinicamente significativa. Indica che il paziente ha avuto un contatto con il parassita.

Una zona grigia potrebbe essere intesa da ciascun laboratorio in relazione alla sua popolazione di pazienti. In caso di borderline o in caso di risultato dubbioso, suggeriamo di ripetere il test nel giro di 2-4 settimane con un campione fresco.

In caso di esito positivo o di risultato dubbioso, si consiglia di eseguire un test di conferma (il più delle volte mediante western blot) a condizione che tale test sia disponibile o richiesto dalle normative nazionali.

Prestazioni analitiche:

Specificità analitica:

È stata riscontrata una specificità del 80% in 40 sieri di pazienti con altre infezioni parassitarie. La reattività incrociata si manifesta principalmente nei pazienti con leishmaniosi, malaria, filariosi e strongiloidosi. Non è stata osservata alcuna interferenza positiva o negativa con concentrazioni sovralfisiologiche di emoglobina, lipidi o bilirubina in sieri integrati con interferenti.

Precisione:

La ripetibilità è stata valutata testando 2 campioni di siero umano in 24 pozzetti di una micropiastra in un unico test. La riproducibilità è stata valutata testando questi 2 campioni in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
Media (densità ottica)	0,612	2,394	0,649	2,449
Deviazione-standard (DO)	0,040	0,162	0,041	0,162
Coefficiente di variazione (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Le seguenti prestazioni non possono essere valutate perché non esiste materiale di riferimento certificato per la presente analisi:

- Sensibilità analitica (limiti di rilevazione e quantificazione)
- Precisione
- Esattezza
- Campo di misura
- Linearità

Prestazioni cliniche:

Sensibilità diagnostica:

È stata riscontrata una sensibilità del 100% in 52 sieri di pazienti affetti da amebiasi invasiva.

Specificità diagnostica:

È stata riscontrata una specificità del 96% in 99 sieri di donatori di sangue (svizzeri). È stata riscontrata una specificità del 89% in 71 sieri di pazienti sospetti di amebiasi, ma con esclusione certa di questa malattia.

Valore predittivo positivo e negativo:

Nelle popolazioni sopra menzionate sono stati riscontrati un PPV del 81% e un NPV del 100%.

Valori attesi nelle popolazioni normali e affette:

In una popolazione normale, in 71 sieri di pazienti con sospetta amebiasi, ma con esclusione certa di questa malattia, il valore atteso dell'indice è 0,57. In una popolazione colpita, in 52 sieri di pazienti affetti da amebiasi invasiva, il valore atteso dell'indice è 5,43.

Incidenti :

È necessario notificare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utente e/o il paziente qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo.

Limitazioni:

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere stabilita sulla base di un singolo risultato. Una diagnosi precisa deve tenere in considerazione la situazione endemica, l'anamnesi clinica, la sintomatologia, così come le informazioni sierologiche. Nei pazienti dal sistema immunitario compromesso e nei neonati, le informazioni sierologiche sono di valore limitato.

Riferimenti bibliografici:

Nicholls, R.S., I Restrepo, M., Duque, S., Consuelo Lopez, M., Corredor, A. (1994) Standardization and evaluation of Elisa for the serodiagnostic of amoebic liver abscess. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 89: 53-58.

Visser, L.G., Verweij, J.J., Van Esbroeck, M., Edeling, W.M., Clerinx, J. Polderman A.M. (2006) Diagnostic methods for differentiation of E. histolytica and E. dispar in carriers : performance and clinical implications in a non-endemic setting. Int. journal of med. microbiol. 296 : 397-403.



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

