

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Test immunoenzimatico per la diagnostica delle echinococcosi umane

96 tests su astine separabili destinate ad uso **in vitro**

Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9350
N° CE: H-CH/CA01/IVD/011757



Usò previsto del prodotto:

Diagnosi sierologica (IgG) dell'idatidosi umana (echinococcosi da *E. granulosus*).

L'uso di questo test può essere raccomandato anche per la diagnosi della echinococcosi alveolare (echinococcosi da *E. Multilocularis*). I casi positivi e dubbi vanno ritestati con l'antigene Em2-Em18 (Articolo N° 9300, Bordier Affinity Products SA) per identificare la specie.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti sensibilizzati con antigene di *Echinococcus granulosus* (liquido idatideo). La presenza di anticorpi sierici specifici rispetto agli antigeni parassitari è evidenziata mediante un coniugato proteina A-fosfatasi alcalina. I pozzetti sono suddivisi in astine separabili, che permettono di testare economicamente delle piccole serie di campioni.

Materiale contenuto nel kit (96 tests):

WELL	9350-01	Pozzetti sensibilizzate con antigene Di <i>Echinococcus granulosus</i> (liquido idatideo) , 96 su astine separabili	96	pozzetti
DILB	9350-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Tampone dell' enzima	50	ml
STOP	9350-05	Soluzione d'arresto (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Siero di controllo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Siero di controllo debamente positivo (soglia)	200	µl
CONTROL +	9350-08	Siero di controllo positivo	200	µl
CONJ	9350-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina	300	µl
SUBS	9350-10	Substrato della fosfatasi	20	Compress e
		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° e 8° C (trasporto a temperatura ambiente). La data di scadenza e il numero del lotto sono stampati sul lato della scatola.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (μl e ml). Recipienti. Provette per la diluizione dei sieri. Bande adesive per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C . Lettore ELISA tarato ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9350-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti. Mettere i pozzetti in un supporto. 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 astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9350-02, 1/10 in acqua distillata.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9350-03, 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.

Sieri di controllo negativi, debolmente positivi (soglia) e positivi: diluire 10 μl di ogni siero di controllo 9350-06 a -08 in 190 μl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20).

Sieri da testare: diluire 10 μl di siero in 2.0 ml della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/201).

Coniugato proteina A - fosfatasi alcalina: diluire il coniugato 9350-09, 1/51 nella soluzione tampone di diluizione.

Soluzione di substrato: equilibrare alla temperatura ambiente il tampone dell'enzima 9350-04. Prima di aggiungere ai pozzetti ELISA il substrato della fosfatasi dissolvere il numero necessario di compresse di substrato 9350-10 nel tampone dell'enzima 9350-04 non diluito (una compressa in 2.5 ml di tampone). Vortexare fino a scioglimento completo della compressa.

Soluzione d'arresto: utilizzare il reagente N° 9350-05 non diluito.



Precauzioni d'uso: Le soluzioni 9350-02, 9350-03, 9350-04 e 9350-09 contengono rispettivamente 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.1% di azoturo di sodio (NaN_3). La soluzione 9350-02 contiene 0.02% di merthiolato. Queste sostanze sono tossiche. La soluzione d'arresto 9350-05 (0.5 M K_3PO_4) è irritante.

I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (9350-06 a -08) provengono da conigli.

Volumi da preparare:

			Numero di pozzetti da utilizzare			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampone di diluizione (10 x)	9350-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. di lavaggio (10 x)	9350-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Coniugato	9350-09 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sieri di controllo	9350-06 a -08 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sieri da testare	Siero + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Soluzione di substrato	9350-10 + 9350-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Metodo:

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 astine sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con i campioni di siero:

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

Riempire i tre pozzetti seguenti con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo).

Riempire gli altri pozzetti con i sieri da testare diluiti (100 µl)

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 proteina A - fosfatasi diluito in ogni pozzetto.

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

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con la 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.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del "bianco" in assenza di siero da tutti gli altri valori. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti : DO del controllo positivo >1.200, DO del controllo negativo < 12 % del controllo positivo, DO del "bianco" misurato contro l'aria < 0.350.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9350-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici **di echinococcosi** e i sieri di soggetti sani.

Il risultato è **negativo** quando la densità ottica del siero da testare è più bassa di quella del siero soglia 9350-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro l'antigene di **Echinococcus granulosus** (liquido idatideo) non è clinicamente significativa

Il risultato è **positivo** quando la densità ottica del siero da testare è più alta di quella del siero soglia 9350-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro l'antigene di **Echinococcus granulosus** (liquido idatideo) è considerata come clinicamente significativa.

Sensibilità e specificità del test:

Una sensibilità del 96 % è stata osservata in un gruppo di 24 pazienti che presentavano una cisti idatidea (*E. granulosus*). Anche la maggioranza (90 %) dei pazienti che soffrono di echinococcosi alveolare (*E. multilocularis*) sono positivi a questo test.

La specificità del test in rapporto ad altre parassitosi è dell' 82 % per i pazienti che soffrono di altre **elmintiasi (toxocarasi, bilarziosi, cisticercosi, filariosi, strongiloidosi e fascioliasi; n=51)** e dell' 83 % per i pazienti affetti da infezioni da **protozoi (amebiasi, leishmaniosi)** e malaria; n=23). La specificità della reazione con sieri di donatori di sangue svizzeri è del 97 % (n=150). Uno studio interno ha mostrato che i sieri lipemici, itterici o emolisati non presentavano problemi per la realizzazione di questo test.

Nelle condizioni di reclutamento abituali di un laboratorio di analisi biologiche in Europa il valore predittivo di un test negativo è vicino al 100 %. Invece un risultato positivo dovrà essere confermato in ogni caso da un test dotato di maggiore specificità (ELISA Em2-Em18 (Art. N° 9300) e immunoblot sulla proteina di 8 kD).

La ripetibilità è stata valutata testando 2 sieri umani 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)	0.586	1.416	0.684	1.654
Deviazione-standard (densità ottica)	0.027	0.064	0.024	0.079
Coefficiente di variazione (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Riferimenti bibliografici:

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.



Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch