

Echinococcus multilocularis (Em18) IgG ELISA

Test immunoenzimatico per il controllo dell'echinococcosi alveolare umana

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



Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9310
UDI-DI: 07640158219317



Uso previsto del prodotto:

Il kit *Echinococcus multilocularis* (Em18) IgG ELISA della Bordier è finalizzato alla rilevazione qualitativa degli anticorpi IgG nei confronti dell'antigene Em-18 della *Echinococcus multilocularis* nel siero umano. Il test è finalizzato per il controllo post terapeutico di pazienti infetti.

Background:

La echinococcosi alveolare è causata dallo stadio larvale dell'*echinococcus multilocularis*, una tenia che si trova nelle volpi, nei coyotes, nei cani e in altri canidi. Gli esseri umani possono essere infettati dall'ingestione involontaria di uova di tenia in seguito a contaminazione di cibo o acqua. Le forme larvali dell'*echinococcus multilocularis* non maturano completamente nelle cisti fertili umane ma la continua proliferazione di vescicole che invadono e distruggono i tessuti circostanti causerà, nello stesso modo che in un tumore, la disfunzione del fegato. Il parassita può propagarsi in altri organi come i polmoni ed il cervello. I sintomi principali sono dolore addominale, astenia, epatomegalia e itterizia. La diagnosi si basa su tecniche ad immagine come le scansioni CT per la rilevazione visiva di masse di parassiti e di rispettive strutture diffuse simili a cisti. I test sierologici vengono utilizzati per le verifiche di popolazioni a rischio e per il controllo di pazienti AE dopo il trattamento.

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 ricombinati Em18 di *Echinococcus multilocularis*. 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 *Echinococcus multilocularis* 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 è manuale ma può essere eseguito anche con sistemi automatici, che devono essere validati dall'utente.

Materiale contenuto nel kit (96 test):

WELL	9310-01	Pozzetti sensibilizzati con gli antigeni ricombinati Em18 di <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	pozzetti
DILB	9310-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x) colorato porpora	50	ml
WASH	9310-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9310-04	Tampone dell'enzima	50	ml
STOP	9310-05	Soluzione d'arresto (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9310-06	Siero di controllo negative (20 x), involucro verde	200	µl
CONTROL -/+	9310-07	Siero di controllo debolmente positivo (soglia, 20 x), involucro giallo	200	µl
CONTROL +	9310-08	Siero di controllo positivo (20 x) involucro rosso	200	µl
CONJ	9310-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina (50x) involucro porpora	300	µl
SUBS	9310-10	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°C e +8°C (trasporto convalidato tra -20°C e +37°C per 21 giorni), 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°C e +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 9310-01 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 astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9310-02, 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 tra +2°C e +8°C.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9310-03, 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 tra +2°C e +8°C.

Sieri di controllo: diluire 10 µl di ogni siero di controllo 9310-06 a -08 in 190 µl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20). I sieri di controllo diluiti sono stabili per 2 mesi tra +2°C e +8°C.

Coniugato: diluire il coniugato 9310-09, 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 9310-10 nel tampone dell'enzima 9310-04 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 9310-05 non diluito.

Raccolta di campioni e preparazione:

Utilizzare siero umano. Conservare tra +2°C e +8°C se analizzato entro 7 giorni, 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). Non conservare campioni diluiti.

Avvertimenti e precauzioni:

I componenti tossici vengono rilevati nella seguente concentrazione:

Componente	Riferimento	Azoturo di sodio (NaN ₃)	Mertiolato
Tampone diluizione (10 x)	9310-02	0,1%	0,02%
Soluzione lavaggio (10 x)	9310-03	0,05%	/
Tampone enzimatico	9310-04	0,01%	/
Sieri di controllo (20 x)	9310-06 a -08	0,1%	0,02%
Coniugato (50 x)	9310-09	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.

Componente	Componente pericoloso	Pittogramma di pericolo	Indicazioni di pericolo	Consigli di prudenza
Soluzione d'arresto	Fosfato di potassio tribasico		Provoca gravi lesioni oculari	Indossare proteggere gli occhi. In caso di contatto con gli occhi: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare

- I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (da 9310-06 a -08) sono di origine animale (conigli) e devono essere maneggiati con cura.
- 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 viene generalmente considerato 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: Preincubazione:

Riempire i pozzetti con 250 µl di soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti alla temperatura ambiente.

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le astine 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 > 3% di A del controllo positivo
- A del controllo negativo < 3% di A del controllo positivo
- A del bianco senza siero < 0,350

Nel caso in cui il segnale di fornitura del campione superi l'intervallo di misurazione del lettore di micropiastre, deve essere attribuito il valore corrispondente all'intervallo di misurazione superiore del lettore.

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

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9310-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di echinococcosi alveolare 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 *Echinococcus multilocularis* non è clinicamente significativa.

Il risultato è **positivo** quando l'indice del campione analizzato è superiore o uguale a **1,0**. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro degli antigeni di *Echinococcus multilocularis* è considerata clinicamente significativa.

La diminuzione o la negativazione dei livelli di anticorpi sierici anti-recEm 18 indica una completa resezione chirurgica della lesione parassitaria o di una inattivazione dei parassiti mediante trattamento di disintossicazione.

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 100% in 12 sieri di pazienti affetti da altre infezioni parassitarie (6 echinococcosi cistica, 3 echinococcosi indifferenziata e 3 diagnosi alternative).

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 duplice copia in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
Media (densità ottica)	0,186	1,260	0,157	1,123
Deviazione-standard (DO)	0,022	0,072	0,016	0,076
Coefficiente di variazione (%)	11,8	5,7	10,5	6,8

Prestazioni cliniche:

Sensibilità diagnostica:

Sono stati studiati campioni di siero pre e post-chirurgici accoppiati di 12 pazienti con conclamata echinococcosi alveolare e sottoposti a chirurgia radicale o non radicale. Prechirurgicamente, 9 pazienti (75%) avevano un indice >1. Tra questi pazienti, in 5 sono stati riscontrati risultati post-chirurgici negativi. Tuttavia, in tutti i 12 pazienti, i livelli post-chirurgici dell'anticorpo Em18 sono caduti ed erano significativamente più bassi rispetto ai campioni prechirurgici. Sono stati studiati campioni di siero di 25 pazienti con conclamata echinococcosi alveolare stabilizzati, non sottoposti ad intervento chirurgico ma trattati con chemioterapia antiparassitaria. 18 (72%) di loro riportavano un indice >1 (indice mediano 6,3). Sono stati studiati campioni di siero di 7 pazienti con conclamata echinococcosi alveolare, non sottoposti ad intervento chirurgico ma con malattia progressiva trattata con chemioterapia antiparassitaria. 6 (86%) di loro riportavano un indice >1 (indice mediano 13,8).

Specificità diagnostica:

È stata riscontrata una specificità del 98% in 99 sieri di donatori di sangue (svizzeri). È stata riscontrata una specificità del 94% in 100 sieri da pazienti di un'unità infettivologica (svizzera).

Valore predittivo positivo e negativo:

Nelle popolazioni sopra menzionate sono stati riscontrati un PPV del 80% e un NPV del 96%.

Valori attesi nelle popolazioni normali e affette:

In una popolazione normale di 99 donatori di sangue svizzeri e in 100 sieri provenienti da un'unità svizzera di infettivologia, il valore atteso dell'indice è 0,33. Non erano disponibili i dati sul valore previsto dell'indice in una popolazione affetta.

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:

Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y., Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., et al. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. Am. J. Trop. Med. Hyg. **80** : 792-7.

Ishikawa, Y., Sako, Y., Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., et al. (2009) Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multiorgan involvement by use of recombinant Em18. J. Clin. Microbiol. **47** : 3191-6.

Tappe, D., Sako, Y., Itoh, S., Frosch, M., Gruner, B., Kern, P., Ito, A. (2010) Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stage. Clin Vaccine Immunol. **17** : 944-8.

Ammann, R.W., Stumpe, K.D.M., Grimm, F., Deplazes, P., Huber, S., Bertogg, K., et al. (2015) Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-Em18/3-10 serology. PLoS Negl Trop Dis. **9**.

Sulima, M., Szostakowska, B., Nahorski, W., Sikorska, K., Wolyniec, W. and Waz, P. (2019) The usefulness of commercially available serological tests in the diagnosis and monitoring of treatment in patients with alveolar echinococcosis. Clin. Exp. Hep. **5** : 327-333.

Hotz, J.F., Peter, L., Kapp-Schworer, S., Theis, F., Eberhardt, N., Essig, A. et al. (2022) Evaluation of Serological Markers in Alveolar Echinococcosis Emphasizing the Correlation of PET-CTI Tracer Uptake with RecEm18 and Echinococcus-Specific IgG. Pathogens **11**020239.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Chemin de Chatanerie 2, 1023 Crissier, Switzerland.

+41 21 633 31 67 cb@bordier.ch www.bordier.ch

