

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de l'amibiase invasive humaine

96 tests sur puits individuels pour utilisation diagnostique in vitro par des laboratoires professionnels



B O R D I E R
A F F I N I T Y
P R O D U C T S

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9550
N° CE: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Utilisations prévues du produit:

Le kit ELISA Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA est destiné à la détection quantitative des anticorps IgG contre *Entamoeba histolytica* dans le sérum humain. La sérologie est une aide au diagnostic et ne doit pas être utilisée comme seule méthode de diagnostic.

Contexte:

L'amibiase est causée par le protozoaire *Entamoeba histolytica*, une amibe pathogène. Les humains peuvent être infectés en ingérant accidentellement des kystes amibiens par la nourriture ou l'eau contaminée. Les symptômes les plus fréquents apparaissent au stade intestinal (maux d'estomac et diarrhée). Cependant, dans certains cas, le parasite deviendra extra-intestinalement invasif et conduira ainsi à la formation d'abcès principalement dans le foie. Les patients souffriront principalement de fièvre et de douleurs abdominales. Le diagnostic de l'amibiase invasive est basé sur des techniques d'imagerie, telles que les tomodensitogrammes, l'échographie, et les IRM pour détecter les lésions hépatiques et un résultat positif par des tests sérologiques. La sérologie est également utilisée pour exclure l'amibiase dans le cadre du diagnostic différentiel avec d'autres maladies hépatiques.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*. Les anticorps spécifiques de l'échantillon se lieront à ces antigènes et les anticorps non spécifiques seront éliminés par lavage. La présence d'anticorps spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Une deuxième étape de lavage éliminera le conjugué non lié. La révélation des anticorps liés est faite par l'addition du substrat pNPP qui devient jaune en présence de phosphatase alcaline. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques d'*Entamoeba histolytica* dans l'échantillon. Le phosphate de potassium ajouté arrêtera la réaction. L'absorbance à 405 nm est lue avec un lecteur de microplaques ELISA.

Le test peut être réalisé avec un système automatisé mais doit être validé par l'utilisateur.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	9550-01	Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de trophozoïtes d' <i>Entamoeba histolytica</i>	96	puits
DILB	9550-02	Tampon de dilution (concentré 10 x), coloré en violet	50	ml
WASH	9550-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	9550-05	Solution d'arrêt (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Sérum de contrôle négatif (20 x), bouchon vert	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil, 20 x), bouchon jaune	200	µl
CONTROL +	9550-08	Sérum de contrôle positif (20 x), bouchon rouge	200	µl
CONJ	9550-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline (50 x), bouchon violet	300	µl
SUBS	9550-10	Substrat de la phosphatase (para-nitrophénylphosphate)	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Durée de vie et conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8°C (transport à température ambiante), éviter l'exposition prolongée des composants à la lumière directe. La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte. Après ouverture initiale, tous les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration lorsqu'ils sont conservés entre 2° et 8°C.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes de dilution. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37°C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm. Équipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits. Vortex. Minuteur.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Équilibrer tous les réactifs à température ambiante et mélanger avant utilisation.

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9550-01 et retirer le nombre de puits nécessaires (un pour le blanc sans sérum, trois pour les contrôles plus le nombre d'échantillons). Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

Tampon de dilution: diluer le tampon de dilution concentré 10x 9550-02, 1/10 dans de l'eau distillée. Il est utilisé pour la dilution des sérums de contrôle, des échantillons et du conjugué. Le tampon dilué est stable pendant 2 mois à 2-8°C.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10x 9550-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline. La solution de lavage diluée est stable pendant 2 mois à 2-8°C.

Sérums de contrôle: diluer 10 μl de chaque sérum 9550-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale 1/20). Les sérums de contrôle dilués sont stables pendant 2 mois à 2-8°C.

Conjugué: diluer le conjugué 9550-09, 1/50 dans la solution de tampon de dilution. Diluer le conjugué le jour du test. Ne pas stocker le conjugué dilué.

Solution de substrat: dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9550-10 dans le tampon de l'enzyme 9550-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette. Diluer le substrat le jour du test et protéger le tube de la lumière directe. Les tablettes et les solutions de substrat doivent être incolores ou ne présenter qu'une légère teinte jaune. Si une tablette ou une solution de substrat devient jaune, elle peut avoir été partiellement hydrolysée et doit être jetée. Ne pas stocker la solution de substrat.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9550-05 non dilué.

Collecte et préparation des échantillons:

Utiliser du sérum humain. Le conserver à 2-8°C s'il est analysé dans les jours suivant le prélèvement, sinon le conserver à -20°C ou moins. Éviter les cycles de congélation/décongélation. Mélanger les échantillons et diluer 1/201 dans la solution de tampon de dilution (par ex. 5 μl d'échantillon dans 1 ml).

Avertissements et précautions:

Les composés toxiques sont trouvés dans les concentrations suivantes:

Composant	Référence	Azide de sodium (Na_2N_3)	Merthiolate
Tampon de dilution (10 x)	9550-02	0.1 %	0.02 %
Solution de lavage (10 x)	9550-03	0.05 %	/
Tampon de l'enzyme	9550-04	0.01 %	/
Sérums de contrôle (20 x)	9550-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Conjugué (50 x)	9550-09	0.1 %	/

Aux concentrations utilisées, l'azide de sodium et le merthiolate ne présentent aucun risque toxicologique au contact de la peau et des muqueuses.

- La solution d'arrêt 9550-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.
- Les sérums de contrôle négatif, seuil et positif (9550-06 à -08) proviennent de lapins.
- Traiter tous les réactifs et les échantillons comme des matières potentiellement infectieuses.
- Ne pas intervertir les réactifs de différents lots ou kits ELISA Bordier.
- Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants avec ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Fermer les flacons de réactif immédiatement après utilisation et ne pas intervertir les bouchons à vis pour éviter toute contamination.
- Utiliser des pointes de pipettes séparées et propres pour chaque échantillon.
- Ne pas réutiliser les micropuits.
- Éviter la détérioration des micropuits par action mécanique (cônes, buses).

- Les descriptions des symboles utilisés sur les étiquettes se retrouvent sur le site internet www.bordier.ch.

Informations d'élimination:

Tous les matériaux utilisés pour ce test sont généralement considérés comme des déchets dangereux. Se reporter aux lois et règlements nationaux et régionaux pour l'élimination des déchets dangereux.

Méthode:

Lors de l'exécution du test, éviter la formation de bulles dans les puits.

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution de tampon de dilution.

Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes au-dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc sans sérum).

Remplir les trois puits suivants avec respectivement 100 µl de sérum de contrôle dilués négatif, faiblement positif (seuil) et positif. Pour des essais de plus de 25 échantillons, nous recommandons de remplir les trois derniers puits avec des sérums de contrôle comme doublon.

Remplir les autres puits avec les échantillons dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37°C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec ~ 250 µl de solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué dilué dans chaque puits (blanc sans sérum inclus).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37°C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec ~ 250 µl de solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37°C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Si besoin, essuyer le dessous des puits et éliminer les bulles éventuelles. Mesurer la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 405 nm dans l'heure qui suit l'addition de la solution d'arrêt.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc sans sérum de toutes les autres valeurs. Le cas échéant, calculer les moyennes des valeurs de DO des sérums de contrôle dupliqués. Le test est valable si les critères suivants sont remplis:

- DO contrôle positif > 1.200
- DO contrôle seuil > 17 % de la DO du contrôle positif
- DO contrôle négatif < 12 % de la DO du contrôle positif
- DO du blanc sans sérum < 0.350

Les contrôles de qualité des lots actuels sont publiés sur notre site internet: www.bordier.ch.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9550-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'amibiase invasive et les sérums de sujets sains.

L'index cut off de chaque échantillon est défini, après soustraction du blanc sans sérum, par la formule suivante:

$$\text{Index} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO sérum seuil}}$$

Le résultat est **négatif** lorsque l'index du sérum à tester est inférieur à 1.0. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes d'*Entamoeba histolytica* n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque l'index du sérum à tester est supérieur à 1.0. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigés contre les antigènes d'*Entamoeba histolytica* est considérée comme cliniquement significative. Cela indique que le patient a eu un contact avec le parasite.

Une zone grise pourra être définie par chaque laboratoire en fonction de sa population de patients. En cas de résultats limites ou douteux, nous recommandons de répéter le test 2 à 4 semaines plus tard avec un nouvel échantillon.

En cas de résultat positif ou douteux, nous recommandons de réaliser un test de confirmation (le plus souvent par western blot) si un tel test est disponible ou requis par un règlement national.

Performances analytiques:

Spécificité analytique:

Une spécificité de 88.5% a été obtenue avec 139 sérums de patients atteints d'autres infections parasitaires. Les réactions croisées surviennent principalement chez les patients atteints de cryptosporidiose, giardiose, hydatidose et filariose.

Une spécificité de 98% a été obtenue avec 90 sérums de patients atteints de maladies hépatiques ou dysimmunitaires.

Aucune interférence positive ou négative n'a été observée avec des concentrations supra-physiologiques d'hémoglobine, de lipides ou de bilirubine dans des sérums supplémentés en interférents.

Fidélité:

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.612	2.394	0.649	2.449
Ecart-type (densité optique)	0.040	0.162	0.041	0.162
Coefficient de variation (%)	6.5	6.8	6.3	6.6

Les performances suivantes ne peuvent pas être évaluées car il n'existe pas de matériel de référence certifié pour cette analyse:

- Sensibilité analytique (limite de détection et seuil de détection)
- Justesse
- Exactitude
- Plage de mesure
- Linéarité

Performances cliniques:

Sensibilité diagnostique:

Une sensibilité de 100% a été obtenue avec 83 sérums de patients atteints d'amibiase invasive.

Une sensibilité de 71.4% a été obtenue avec 14 sérums de patients atteints d'amibiase digestive.

Spécificité diagnostique:

Une spécificité de 95.3% a été obtenue avec 80 sérums de donneurs de sang français, 18 sérums de donneurs de selles pour greffe fécale, 60 sérums de patients dysimmunitaires et 33 sérums de patients souffrants d'autres pathologies hépatiques.

Valeur prédictive positive et négative:

Une VPP de 90.3% et une VPN de 100% ont été obtenues avec les populations mentionnées ci-dessus (hors amibiase digestive).

Valeurs attendues dans la population normale et touchée:

Une valeur attendue d'index 0.35 a été obtenue dans la population normale et d'index 4.19 dans la population touchée (hors amibiase digestive).

Limitations:

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne doit pas être établi sur la base du résultat d'un seul test. Un diagnostic précis doit prendre en compte la situation endémique, l'histoire clinique, la symptomatologie, l'imagerie ainsi que les données sérologiques. Chez les patients immunodéprimés et les nouveau-nés, les données sérologiques ont une valeur limitée.

Incidents:

Tout incident grave survenu en lien avec le dispositif fait l'objet d'une notification au fabricant et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Références:

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.

