

Sierodiagnosi dell'idatidosi mediante emagglutinazione indiretta

(Ref. 66604)

Solo per uso diagnostico *in vitro*, solo per uso professionale.



ELI.H.A *Echinococcus* consente la determinazione quantitativa degli anticorpi sierici *anti-Echinococcus granulosus* mediante emoagglutinazione indiretta. La popolazione target comprende chiunque sia sospettato di idatidosi. Ogni kit consente di eseguire 102 test o 17 reazioni di 6 diluizioni.

L'infezione da idatidosi da *E. granulosus* è caratterizzata da una progressione lenta e insidiosa della malattia. L'infezione è relativamente asintomatica e la diagnosi biologica si basa principalmente sul rilevamento degli anticorpi.

La manipolazione è semplice e veloce, con risultati disponibili entro 2 ore.

Descrizione	Quantità
R1: flaconcino da 2,2 mL di globuli rossi sensibilizzati	1
R2: fiala da 2,2 ml di globuli rossi non sensibilizzati	1
BUF: flaconcino da 55 ml di tampone fosfato pH 7,2	1
R3 : flaconcino da 2 mL di adsorbente	1
CONTROL + : fiala da 0,2 mL di controllo positivo titolato	1
CONTROLLO - : fiala da 0,2 mL di controllo negativo	1
MICROPIASTRA : micropiastrea con fondo a U	2
CONTOGOCCE : contagocce speciale	2

- Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

- Durante la dispensazione dei reagenti R1 e R2, assicurarsi che il contagocce sia perfettamente verticale. Verificare l'assenza di bolle d'aria nelle gocce per garantire volumi di erogazione costanti.

Utilizzare siero fresco ottenuto dopo il prelievo di sangue in provette asciutte (conservabili fino a 7 giorni a 2-8 °C o a -20 °C per periodi superiori a 7 giorni) e che non presentino emolisi, opacità, ittero o contaminazione. Si consiglia a ciascun laboratorio di verificare la compatibilità delle provette di raccolta utilizzate. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non decomprimere il siero.

I reagenti conservati a 2-8 °C nelle loro condizioni originali e dopo l'apertura sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non devono essere congelati.

- Pipetta/e automatica/e con volume di pipettatura adeguato al volume da misurare;
- Contenitori per rifiuti contaminati;
- Centrifuga;
- Provette per emolisi.

Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso.

- 50 µL di siero;
- 1,95 mL di reagente BUF.

In questo modo si ottengono diluizioni da 1:80 a 1:2560.

Questa diluizione (1:80) è il controllo del siero, il cui ruolo è quello di rilevare le agglutinine anti-pecora naturali che potrebbero essere presenti in alcuni campioni di siero.

- Aggiungere 1 goccia di reagente R1 all'ottavo pozzetto (controllo del reagente) che ha la funzione di controllare la validità del BUF e del reagente R1.

Nota: eseguire un solo controllo del reagente per ogni serie di test.

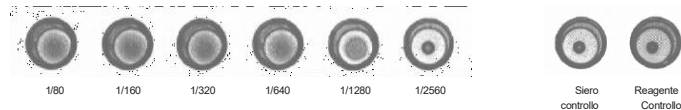
- manualmente, picchiettando lateralmente il lato della micropiastre appoggiata in piano sul banco;
- oppure utilizzando un agitatore a piastra vibrante per piastre da microtitolazione (ad esempio a 1300 giri/min per 10 secondi). Non utilizzare un agitatore orbitale.

- Leggere la reazione dopo 2 ore. I risultati possono essere interpretati dopo un minimo di 1,5 ore e fino a un massimo di 24 ore.

- Seguire i passaggi descritti nella sezione "Esecuzione del test su micropiastra", sostituendo però la diluizione madre con la diluizione madre adsorbita.

Presenza di un deposito torbido rosso/marrone che ricopre il pozzetto, talvolta con la presenza di un sottile bordo periferico.

Esempio: siero positivo a una diluizione di 1/1280.



Reazione significativa a favore di idatidosi progressiva. 12 –

I reagenti CONTROL+ e CONTROL- devono essere trattati come sieri di prova. Il titolo del reagente CONTROL+ deve essere uguale al titolo stampato sull'etichetta della fiala $\pm$ una diluizione. Non deve esserci alcuna emoagglutinazione del CONTROL-. Se è presente emoagglutinazione, il test non è valido.

13 – CAUSE DI ERRORI E LIMITI DEL TEST

- Cattiva conservazione del siero.
- Cattiva conservazione dei reagenti dopo l'apertura.
- Utilizzare solo i contagocce forniti nel kit.
- Utilizzare esclusivamente le piastre fornite nel kit con pozzetti a fondo a forma di U.
- Non scambiare i contagocce tra i reagenti R1 e R2.
- In caso di reazione positiva nei primi 6 pozzetti, eseguire un'ulteriore diluizione seriale per determinare il limite di titolo dell'emoagglutinazione.
- Il controllo sierico deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoagglutinazione di questo controllo, sarà necessario ripetere il test dopo aver eliminato dal siero le agglutinine naturali anti-pecora mediante adsorbimento.
- Il controllo del reagente deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoagglutinazione di questo controllo, il kit **ELI.H.A Echinococcus** non può essere utilizzato.
- Alcuni sieri con una concentrazione di anticorpi molto elevata possono dare origine a un fenomeno di zona (con scomparsa dell'opacizzazione) nelle diluizioni iniziali, che scompare nelle diluizioni successive.
- La qualità dei reagenti consente di eseguire la reazione e di leggere il test la mattina seguente, a condizione che la micropiastro non venga spostata in alcun modo e sia protetta da qualsiasi fonte di vibrazione.
- Non riutilizzare un pozzetto già utilizzato per eseguire un test.
- La nomenclatura francese per le procedure di biologia medica specifica che, per lo screening sierologico dell'echinococcosi, la ricerca degli anticorpi *anti-Echinococcus* deve essere effettuata utilizzando due tecniche diverse. Ciò al fine di eliminare eventuali interferenti sconosciuti. L'interpretazione complessiva di questa sierologia deve quindi basarsi sui risultati delle diverse tecniche utilizzate. In tutti i casi, è necessario che i dati clinici, epidemiologici e biologici siano presi pienamente in considerazione prima di stabilire la diagnosi definitiva.
- Senza muovere o vibrare la micropiastro, il test può essere eseguito la sera e letto la mattina successiva (cioè dopo un tempo di reazione massimo di 24 ore).

14 – PRESTAZIONI

14.1 – PRESTAZIONI ANALITICHE

14.1.1 – Ripetibilità

Su siero positivo, il dispositivo ha una ripetibilità del 100% con una tolleranza accettabile di una differenza di un pozzetto. Su siero negativo, il dispositivo ha una ripetibilità del 100% senza tolleranza per la positività nel risultato. I pozzetti di controllo del siero e dei reagenti hanno una ripetibilità del 100%.

14.1.2 – Riproducibilità

Su siero positivo, il dispositivo ha una riproducibilità del 100% con una tolleranza accettabile di una differenza di un pozzetto. Su siero negativo, il dispositivo ha una riproducibilità del 100% senza tolleranza per la positività nel risultato. I pozzetti di controllo del siero e dei reagenti hanno una riproducibilità del 100%.

14.1.3 – Interferenza

A causa dell'elevata omologia genetica tra le due specie di *Echinococcus*: *E. multilocularis* ed *E. granulosus*, sono necessari test secondari per escludere la reattività crociata (9). Sono state osservate reazioni crociate con campioni positivi per anticorpi *anti-Fasciola* o anticorpi *anti-S. mansoni* (2). Sono state osservate reazioni crociate con campioni provenienti da pazienti affetti da toxoplasmosi, HIV, EBV, aspergillosi, filariasi e clonorchiasi (1,3).

È stata studiata la potenziale interferenza con emoglobina, lipidi e bilirubina secondo le raccomandazioni CLSI EP07 (4,5,6,7,8). Non è stata rilevata alcuna interferenza significativa fino alle seguenti concentrazioni massime:

Sostanze testate	Concentrazioni massime
Bilirubina	800 mg/L
Lipidi	15 g/L
Emoglobina	10 g/L

Un'approfondita revisione della letteratura ci ha permesso di escludere potenziali interazioni farmacologiche, riducendo al minimo il rischio associato a eventuali interferenti non ancora identificati.

14.2 – PRESTAZIONI CLINICHE

ELI.H.A Echinococcus è costituito da globuli rossi sensibilizzati da un antigene *Echinococcus granulosus*. Garantisce sensibilità e specificità nella reazione. Uno studio condotto su 221 sieri umani ha dimostrato una sensibilità del 93,0% (indipendentemente dalla posizione della cisti) e una specificità del 94,9%. Il confronto con i test IFI ed ELISA ha evidenziato una notevole complementarità tra queste diverse reazioni (1).

Le prestazioni cliniche del kit **ELI.H.A Echinococcus** sono state valutate mediante una revisione della letteratura scientifica basata su cinque pubblicazioni tra il 2009 e il 2023 (2,10,11,12,13).

Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Tabella 1: Prestazioni cliniche per una soglia di 1/160

Studio	Studio n. 4 [12]
Anno di pubblicazione	2023
Popolazione	23 sieri di pazienti con sospetta echinococcosi cistica
Metodo comparativo (standard di riferimento)	Esame istopatologico
Sensibilità 1/160	94% ^a
Specificità 1/160	100% ^a
PPV ^a 1/160	100% ^a
NPV ^a 1/160	85,7% ^a

Tabella 2 e 3: Prestazioni cliniche per una soglia di 1/320

Studio	Studio n. 1 [10]			Studio n. 2 [11]	Studio n. 3 [2]		
Anno di pubblicazione	2009			2024	2010		
Popolazione	19 sieri provenienti da pazienti affetti da cisti idatoidi polmonari	40 sieri di pazienti affetti da parassitosi e altre malattie polmonari	20 sieri di soggetti sani	74 sieri di pazienti con sospetta echinococcosi cistica (51 donne e 23 uomini di età compresa tra 3 e 86 anni)	30 sieri provenienti da pazienti affetti da echinococcosi cistica e senza altre infezioni parassitarie	30 sieri di pazienti affetti da altre parassitosi, <i>S. mansoni</i> (n=6), <i>Fasciola</i> (n=6), <i>H. nana</i> (n=6), <i>E. histolytica</i> (n=6) e <i>Giardia lamblia</i> (n=6).	10 sieri di pazienti privi di parassitosi
Metodo comparativo (standard di riferimento)	Risultati operativi	NA	NA	Risultati delle relazioni cliniche e radiologiche	Analisi cliniche e chirurgia	NA	NA
Sensibilità 1/320	73,6			70,8	86,7		
Specificità 1/320	98,3			96,2	95		
PPV ^a 1/320	93,3			97,1	92,9		
NPV ^a 1/320	92,1			64,1	90,5%		

Studio	Studio n. 4 [12]	Studio n. 5 [13]		
Anno di pubblicazione	2023	2016		
Popolazione	23 sieri di pazienti con sospetta echinococcosi cistica echinococcosi	18 sieri di bambini con echinococcosi cistica	27 sieri di adulti con echinococcosi cistica	20 sieri di soggetti sani
Metodo comparativo (standard di riferimento)	Esame istopatologico	Esame clinico e imaging medico		
Sensibilità 1/320	82,4% ^a	88,9% ^a		
Specificità 1/320	100% ^a	100% ^a		
PPV ^a 1/320	100% ^a	100% ^a		
NPV ^a 1/320	66,7% ^a	80% ^a		

^a: PPV: Valore predittivo positivo

^a: NPV: Valore predittivo negativo

^a: Valore calcolato da ELITech Microbio

Nella letteratura scientifica, la sensibilità clinica e la specificità per una soglia di **significatività** di 1/160 sono rispettivamente del 94% e del 100%. Per una soglia di **significatività** di 1/320, la sensibilità clinica e la specificità variano rispettivamente dal 73,6% all'88,9% e dal 95% al 100%. Per una soglia di **significatività** di 1/160, il PPV è del 100% e il NPV è dell'85,7%. Per una soglia di **significatività** di 1/320, il PPV varia dal 92,86% al 100% e il NPV varia dal 66,67% al 92,1%.

15 – SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti in conformità con le norme igieniche e le normative vigenti per questo tipo di prodotto nel paese di utilizzo. In caso di fuoriuscita del reagente BUF, pulire l'area di lavoro con carta assorbente e risciacquare con acqua. Se sull'area di lavoro viene versato il siero di un altro reagente, pulire con candeggina e carta assorbente.

16 – BIBLIOGRAFIA

1. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L'emagglutinazione indiretta nella sierodiagnostica dell'idatidosi. Confronto con l'immunofluorescenza indiretta e la tecnica ELISA - Lyon Médical, 1979, 241, 755-759.
2. El-Shazly AM, Saad RM, Belal US, Sakr T, Zakae HA. Valutazione dei test ELISA e IHAT nella diagnosi sierologica di casi accertati di idatidosi umana. J Egypt Soc Parasitol. 2010;40(2):531-538.
3. Van Doorn HR, Hofwegen H, Koelewijn R, et al. Diagnosi sierologica affidabile dell'echinococcosi cistica importata con un test commerciale di emoagglutinazione indiretta. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;57(4):409-412.
4. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Colmare le lacune con fluidi corporei non standard. Pract Lab Med. 16 marzo 2016;5:24-31. doi: 10.1016/j.plabm.2016.03.003. PMID: 28850201; PMCID: PMC5574517.
5. CLSI. Test di interferenza nella chimica clinica. 3a ed. Linee guida CLSI EP07. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. pagg. 23-24
6. CLSI. Tabelle supplementari per i test di interferenza nella chimica clinica. 1a ed. Supplemento CLSI EP37. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. pagg. 94-96
7. Iperbilirubinemia neonatale - Pediatria - Edizione professionale del Manuale MSD § Eziologia dell'iperbilirubinemia neonatale p5 (msdmanuals.com)
8. Bilirubina - Normes biologiques - Cours IFSI - Fiches IDE §Présence d'ictère p3 (fiches-ide.fr)
9. Schwarz NG, Loderstaedt U, Hahn A, et al. Diagnostica microbiologica di laboratorio delle malattie zoonotiche trascurate (NZDs). Acta Trop. 2017;165:40-65. doi:10.1016/j.actatropica.2015.09.003
10. Eris FN, Akisu C, Aksay U. Valutazione di due test ELISA e due test di emoagglutinazione indiretta per la sierodiagnosi della malattia idatidea polmonare. Korean J Parasitol. 2009;47(4):427-429. doi:10.3347/kjp.2009.47.4.427
11. Erganis, S., Sarzhanov, F., Al, F.D. et al. Confronto tra metodi di diagnosi sierologica dell'echinococcosi cistica. Acta Parasit. 69, 1122–1131 (2024). https://doi.org/10.1007/s11686-024-00840-z
12. Yülek Ö, Genç Bağçe Y, Demir H. L'importanza del test di emoagglutinazione indiretta nella diagnosi dell'echinococcosi cistica: correlazione sierologica-istopatologica. Cerrahpaşa Med J. 2023;47(2):129-134.
13. El-Ghareeb AS, Waked NM, Al-Feky HM. STUDI CLINICI E PARASSITOLOGICI SULLE CISTI IDATIDEI POLMONARI ED EPATICI IN BAMBINI E ADULTI RICOVERATI IN OSPEDALE. J Egypt Soc Parasitol. 2016;46(1):9-18. doi:10.12816/0026145

Qualsiasi incidente grave correlato al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore.

Le modifiche rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

Allée d'Athènes

83870 SIGNES - France

☎: 33 (0)4 94 88 55 00

http://www.elitechgroup.com

