

ELI.H.A *Aspergillus*

Sierodiagnostica dell'aspergillosi tramite emoaagglutinazione indiretta

102 Tests
(Ref. 44602)

8000110-IT-2012-07

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



1 - SCOPO

ELI.H.A *Aspergillus* consente la determinazione di quantitativa degli anticorpi anti-*Aspergillus fumigatus* in campioni di siero tramite emoaagglutinazione indiretta. Il kit consente di eseguire 102 test o 17 reazioni di 6 diluizioni.

2 - INTRODUZIONE

Aspergillus fumigatus è la specie più frequentemente incriminata nella patologia umana. Lei ha una capacità speciale di adattarsi al parassitismo negli esseri umani.

Tuttavia, sono necessarie condizioni favorevoli per il suo sviluppo:

- locale (cavità preformate, accessi polmonari detergenti, mucosa alterata, ecc.)
- generale (settore immunocompromesso legato a tecniche mediche e chirurgiche pesanti: innesti, immunosoppressori, corticosteroidi, antibiotici, ecc.)

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A *Aspergillus* si basa su emoaagglutinazione indiretta. Eritrociti sensibilizzati sono composti di eritrociti di pecora rivestiti con un antigene *Aspergillus fumigatus*.

La presenza degli anticorpi specifici in campioni di siero è rivelata da un'agglutinazione dei eritrociti sensibilizzati: una pellicola rossicia-marrone nel pozzo. In assenza degli anticorpi specifici, questi eritrociti si depositano e formano un anello sul fondo del pozzetto.

Eritrociti non sensibilizzati, assicura la specificità della reazione e permette l'eliminazione di interferenze dovute alle agglutinine anti-pecora naturali (eteroanticorpi di Forssman, anticorpi della mononucleosi infettiva...).

La reazione viene effettuata in micropiastria a U.

L'esecuzione del test è semplice e rapida. I risultati si ottengono in 2 ore.

4 - CONTENUTO DE LA CONFEZIONE

Descrizione	Quantità
R1: Fiala di 2,2 mL dei eritrociti sensibilizzati	1
R2: Fiala di 1 mL dei eritrociti non sensibilizzati	1
BUF: Fiala di 55 mL di soluzione tampone fosfato pH 7,2	1
R3: Fiala di 2 mL di sostanza	1
CONTROL +: Fiala di 0,2 mL di controllo positivo titolato	1
CONTROL -: Fiala di 0,2 mL di controllo negativo	1
MICROPLATE: Micropiastre a U	2
DROPPER: Contagocce speciali	2

5 - AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

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

- I test sono intesi per uso singolo.

- Tutti i reagenti, eccetto di reagente BUF, contengono materiale di origine animale. Conseguentemente, devono essere manipolati come componenti pericolosi.

- I campioni sono potenzialmente infettivi. Devono essere maneggiati con le consuete precauzioni, nel rispetto delle norme igieniche e le normative vigenti nel paese di utilizzo.

- Le fiale CONTROL contengono sodio azide (con una contrazione inferiore allo 0,1% p/p).

- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

- Non scambiare reagenti e controlli provenienti da lotti diversi.

- Lasciare tornare a temperatura ambiente i reagenti e i campioni prima di effettuare il test.

- Agitare con cautela i reagenti R1 e R2 prima dell'uso.

- Quando si versano i reagenti R1 e R2, accertarsi che l'ago del contagocce sia perfettamente verticale. Verificare che non vi siano bolle d'aria nelle gocce per assicurare volumi di erogazione costanti.

6 - PRELIEVO/PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Utilizzare sieri freschi o sieri conservati a -20°C. Non usare siero emolizzato, torbido o contaminato.

Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti.

Non decompilare il siero.

7 - MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti sono pronti per l'uso. Conservare a +2...+8°C, fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.

8 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Pipetta/e automatica/e con volume di pipettaggio adattato alla quantità da misurare
- Contenitore per rifiuti contaminate
- Centrifuga
- Tubi per emolisi

9 - ESECUZIONE DEL TEST

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti e i campioni tornino a temperatura ambiente.

9.1 - Preparazione di diluizione stock 1/40 di siero test

Diluire il siero da testare a 1/40:

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

9.2 - Esecuzione del test su micropiastria

- Tramite una micropipetta multicanale, versare 50 µL di reagente BUF in 8 pozzetti della micropiastria.

- Tramite una micropipetta, aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nel primo pozzetto. Mescolare con il reagente BUF e trasferire, preferibilmente tramite un microdiluitore, 50 µL dal primo pozzetto nel secondo pozzetto, dal secondo pozzetto al terzo, e così via fino al sesto pozzetto. Scartare 50 µL dal sesto pozzetto. Otteniamo così le diluizioni da 1/80 fino a 1/2560.

- Aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nell'ottavo pozzetto. Mescolare con il reagente BUF e scartare 50 µL. Questa diluizione 1/80 costituisce il controllo del siero e serve per il rilevamento di agglutinine anti-pecora naturali, che possono verificarsi in alcuni sieri.

- Agitare con cautela le reagenti R1 e R2.

- Distribuire una goccia di reagente R1 nei primi sei pozzetti.
- Distribuire una goccia di reagente R2 nella settima pozzetto (controllo del siero).
- Distribuire una goccia di reagente R1 in otava pozzetto (controllo del reagente). La sua funzione è quella di controllare la validità del reagente BUF e del reagente R1.

Nota : Predisporre solo un controllo del reagente per serie di saggi.

- Con molta cautela, omogeneizzare il contenuto dei pozzetti :

- Manualmente, dando leggeri colpi ai lati della micropiastria, posizionata di piatto
- O con un vibratore-agitatore per micropiastre (ad esempio 1300 giri/min per 10 secondi). Non utilizzare agitatore orbitale.

- Poi lasciare ferma la piastra, lontano da vibrazioni.

- Leggere la reazione due ore dopo.

9.3 - Assorbimento delle agglutinine anti-pecora naturali in caso di agglutinazione del controllo del siero

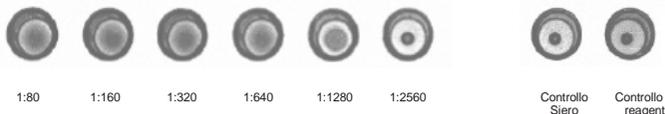
- Agitare con cautela il reagente R3.
- Introdurre in un tubo e mescolare :
 - 0,1 mL di siero test ;
 - 0,3 mL di reagente R3.
- Incubare per 60 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 giri/min per 15 min.
- Raccogliere il fluido supernatante ; il siero quindi è diluito 1/4.
- Diluire il fluido supernatante 1/10 con il reagente BUF per ottenere una soluzione stock adsorbita (1/40).
- Seguire il protocollo di "Esecuzione del test su micropiastria" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

10 - LETTURA DEI RISULTATI

Reazione negativa: No emoaagglutinazione
Presenza di sul fondo del pozzetto. un anello piu o meno ampia

Reazione positiva: Emoagglutinazione
Presenza di una pellicola rossicia-marrone nel pozzetto : talvolta, la presenza di un anello periferico sottile

Esempio: siero positivo a 1/1280



11 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Titolo < 1:320: Reazione non significativo
Probabile assenza di aspergillosi profonda. Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una electrosyneresis o un immunoelettroforesi.

Titolo = 1:320: Reazione equivoco.
Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una electrosyneresis o un immunoelettroforesi.

Titer ≥ 1:640: Reazione significativo a favore di una aspergillosi profonda.

12 - CONTROLLO DELLA QUALITÀ INTERNO

Ogni kit include CONTROL - e CONTROL + titolati, pronti all'uso e da eseguire come i campioni. Questi controlli convalidano il test. Il titolo del CONTROL + deve essere pari a ± una diluizione rispetto a quella indicata sull'etichetta della fiala. Non deve essere riscontrata emoaagglutinazione con il CONTROL -. Altrimenti il test non è valido.

13 - CAUSE DI ERRORE E LIMITAZIONI DEL TEST

- Cattiva conservazione del siero.
- Cattiva conservazione dei reagenti dopo l'apertura.
- Utilizzare esclusivamente i contagocce forniti nel kit.
- Non scambiare i contagocce tra reagenti R1 e R2.
- In caso di reazione positiva nei primi sei pozzetti, effettuare diluizioni più elevate per determinare il titolo di emoaagglutinazione limite.
- Il controllo del siero deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoaagglutinazione di questo controllo, è necessario ripetere il test dopo l'eliminazione delle agglutinine anti-pecora naturali tramite assorbimento.
- Il controllo del reagente deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoaagglutinazione di questo controllo, il reagente ELI.H.A *Aspergillus* non potrebbe essere usato.
- Alcuni sieri, con un titolo anticorpale molto elevato, possono causare un fenomeno di zona (con retrazione della pellicola) alle prime diluizioni, che scompare con diluizioni crescenti.
- La qualità dei reagenti permette l'effettuazione della reazione di sera, con lettura la mattina successiva, purché la micropiastria rimanga immobile e protetta da vibrazioni.
- In qualsiasi caso, la diagnosi dovrebbe essere avanzata usando i risultati di questo test insieme agli altri riscontri clinici, epidemiologici e di laboratorio.

14 - PRESTAZIONI DEL KIT

ELI.H.A *Aspergillus* è composto dei eritrociti sensibilizzati da un antigene *Aspergillus fumigatus*, che assicura sensibilità e specificità per la reazione di emoaagglutinazione indiretta.

Quindi, i risultati delle valutazioni di ELI.H.A *Aspergillus* mostrano una sensibilità del 80 % e una specificità del 98 %.

15 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I campioni, i reagenti e i materiali e i prodotti contaminati devono essere smaltiti in un contenitore apposito per i rifiuti contaminati, in conformità alle raccomandazioni e norme vigenti per questa tipologia di prodotto nel paese di utilizzo.

In caso di versamento accidentale di reagente BUF, pulire la superficie con carta assorbente e acqua. In caso di versamento di siero o di un altro reagente, pulire la superficie con carta assorbente, acqua e candeggina.

16 - REFERENZE

- J. CAPDEVILLE, S. FIABANE - Diagnostic immunologique des aspergilloses - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XII, N° 121, 205-249.
- B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417-455.
- J.-M. SENET, C. BRISSET - The diagnosis of aspergillosis by passive haemagglutination - *Biomedicine*, 1973, 19, 365-368.
- J.-M. SENET, R. ROBERT, E. PICHOT - Intérêt de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic précoce de l'aspergillose - *Bulletin de la Société de Mycologie Médicale*, 1974, Tome III, N° 1, 45-48.
- J.-M. SENET, R. ROBERT - Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmose et à l'aspergillose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tome 11, N° 1, 39-42.
- A. CULINO, M. MIEGEVILLE, O. MORIN - Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire - *Feuilles de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N°137, 51/57.
- M. MIEGEVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillose chez des malades à "hauts risques" - *Feuilles de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, N° 148, 37-39.
- M.-C. GBADAMASSI, C. CIVADIER, T. SANDRE, T.-H. DUONG, C. COMBESCOT - Diagnostic immunologique de l'aspergillose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en œuvre au laboratoire - *Feuilles de Biologie*, 1989, Vol. XXX, N°169, 31-34.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziati in grigio.



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61
<http://www.elitechgroup.com>