

ELI.H.A *Schistosoma*

Serodiagnóstico da bilharzia hemaglutinação indireta

120 testes
(Ref. 66600)



8000120-PT-2018-10

Apenas para uso diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.

1 - OBJETIVO

ELI.H.A *Schistosoma* permite a determinação quantitativa, por hemaglutinação indireta, de anticorpos séricos de pacientes com bilharzias causada por *Schistosoma mansoni* (forma intestinal) e *Schistosoma haematobium* (forma urinária). Cada kit permite realizar 120 testes ou 20 reações de 6 diluições.

2 INTRODUÇÃO

As bilharzias, ou esquistossomose, representam um grupo de doenças parasitárias causadas pelos vermes planos não segmentados do gênero *Schistosoma*. A imunidade é adquirida progressivamente na presença de vermes adultos. No entanto, são os ovos do esquistossomo que são o elemento patogênico da doença. A doença prossegue em três fases sucessivas: contaminação - invasão - estado da doença. O diagnóstico de bilharzia pode ser feito pela identificação dos ovos, mas estes não podem ser detectados antes da fase de "estado de doença". O diagnóstico imunológico do parasita é, portanto, essencial nos estágios iniciais desta doença.

3 - PRINCÍPIO

ELI.H.A *Schistosoma* baseia-se no princípio da hemaglutinação indireta. Os glóbulos vermelhos sensibilizados consistem em glóbulos vermelhos de ovelha cobertos com um antígeno de *Schistosoma mansoni*. A presença de anticorpos séricos específicos resulta na aglutinação dos glóbulos vermelhos sensibilizados, resultando em um depósito vermelho/marrom turvo cobrindo o poço. Na ausência de anticorpos específicos, os glóbulos vermelhos formam um depósito semelhante a um anel no fundo do poço. Os glóbulos vermelhos não sensibilizados garantem a especificidade da reação, possibilitando eliminar qualquer interferência das aglutininas naturais antissépticas (heteroanticorpos de Forssman, anticorpos de mononucleose infecciosa...). A reação é realizada em microplaca U. A manuseio é simples e rápido, com resultados em 2 horas.

4 - REAGENTES E MATERIAL

Descrição	Quantidade
R1: Frasco de 2,4 mL de glóbulos vermelhos sensibilizados	1
R2: Frasco de 1 mL de glóbulos vermelhos não sensibilizados	1
BUF: Frasco de 55 mL de tampão fosfato pH 7,2	1
R3: Frasco de 2 mL de adsorvente	1
CONTROLE +: Frasco de 0,2 mL de controle positivo titulado	1
CONTROLE -: Frasco de 0,2 mL de controle negativo	1
MICROPLACA: Microplaca com fundo em U	2
CONTA-GOTAS: CONTA-GOTAS ESPECIAL	2

5 - PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas ao uso de diagnóstico *in vitro* e devem ser manuseados por pessoal autorizado. Os testes são apenas para uma única utilização.
- Todos os reagentes, exceto o reagente **BUF**, contêm matérias-primas de origem animal e devem ser manuseados com cautela.
- As amostras de pacientes são potencialmente infecciosas. Eles devem ser manuseados com cautela, em observância às regras de higiene e aos regulamentos vigentes para este tipo de produto no país de uso.
- Os reagentes **DE CONTROLE** contêm azida de sódio (<0,1%).
- Não utilizar após a data de validade.
- Não use reagentes de números de lote diferentes.
- Antes de usar, deixe o soro e os reagentes atingirem a temperatura ambiente.
- Agite cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.
- Ao distribuir os reagentes **R1** e **R2**, certifique-se de que o conta-gotas esteja perfeitamente vertical. Verifique a ausência de bolhas de ar nas gotas para garantir volumes de entrega constantes.

6 - COLETA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

Use soro fresco ou soro preservado a -20°C, e não mostrando nenhum sinal de hemólise, nebulosidade ou contaminação.

Evite o congelamento e descongelamento repetidos. Não desfaça o soro.

7 - ESTABILIDADE, ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Os reagentes estão prontos para uso.

Todos os reagentes armazenados a 2-8°C, em sua embalagem original, são estáveis até o prazo de validade indicado na caixa. Não congelar.

8 - MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Pipeta(s) automática(s) com volume de pipetagem adaptado ao volume que será medido;
- Recipientes de resíduos contaminados;
- Centrifugadora
- Tubos de hemólise.

9 - MÉTODO

Deixar que a vacina atinja a temperatura ambiente antes de administrar.

9.1 - Preparação da amostra

Realizar diluição 1:40 do soro a ser testado:

- 50 µL de soro;
- 1,95 mL de reagente **BUF**.

9.2 - Realização do ensaio em microplaca

- Usando uma micropipeta multicanal, adicione 50 µL de reagente **BUF** a 8 poços da microplaca.
- Usando uma micropipeta, adicione 50 µL de soro diluído ao primeiro poço. Misture o soro com o reagente **BUF** e realize uma diluição em série, de preferência usando um microdiluidor, transferindo 50 µL do primeiro poço para o segundo poço, depois 50 µL do segundo o ao terceiro poço e assim por diante até que o sexto poço seja atingido. 50 µL do sexto poço são então descartados. Desta forma, são obtidas diluições de 1:80 a 1:2560.
- Adicionar 50 µL de soro diluído ao sétimo poço. Misture o soro com o reagente **BUF** e depois descarte 50 µL. Esta diluição (1:80) é o controle sérico, cujo papel é detectar as aglutininas naturais antivegetativas que podem estar presentes em certas amostras de soro.

Agitar cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2**.

- Adicione 1 gota de reagente **R1** aos primeiros seis poços.
- Adicione 1 gota de reagente **R2** ao sétimo poço (controle de soro).
- Adicione 1 gota de reagente **R1** ao oitavo poço (controle de reagente) cujo papel é controlar a validade do reagente **BUF** e **R1**.

Nota: Realize apenas um controle de reagente para cada série de testes.

- Com muito cuidado, agite o conteúdo dos poços:
 - manualmente, batendo lateralmente no lado da microplaca que foi colocado no banco;
 - ou utilizando um agitador de placas vibratórias para placas de microtitulação (por exemplo, a 1300 rpm durante 10 segundos). Não use um agitador orbital.
- Agora deixe a placa descansar, longe de quaisquer fontes de vibração.
- A placa pode ser lida após 2 horas.

9.3 - Adsorção das aglutininas naturais antissépticas em caso de aglutinação do controle sérico

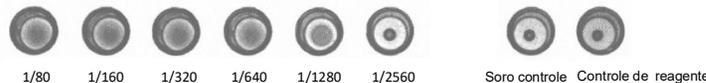
- Agitar cuidadosamente o reagente **R3**.
- Num tubo, adicionar e misturar:
 - 0,1 mL de soro;
 - 0,3 mL de reagente **R3**.
- Incubado à temperatura ambiente por 60 minutos.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
- Recolher o sobrenadante; o soro está agora numa diluição de 1:4.
- Realizar uma diluição 1:10 do sobrenadante no reagente **BUF** para obter uma diluição de reserva adsorvida (1:40).
- Siga as etapas descritas em "Realização do ensaio em microplaca", mas substitua a diluição do estoque pela diluição do estoque adsorvido.

10 - LEITURA

Reação negativa: Ausência de hemaglutinação. Presença de um anel mais ou menos grande no fundo do poço.

Reação positiva: Presença de hemaglutinação. Presença de um depósito vermelho/marrom nublado cobrindo o poço, às vezes há a presença de uma borda periférica fina.

Exemplo: soro positivo a uma diluição de 1:1280



11 - INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Título < 1:160: Reação não significativa de uma infecção progressiva. Pode corresponder a uma infecção anterior ou tratada. Renove o teste 2 a 3 semanas depois e também realize um teste de eletrossinêrese ou imunoelctroforese.

Título ≥ 1:160: Reação significativa. Presunção de uma infecção activa.

12 - CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Os reagentes **DE CONTROLE +** e **CONTROLE -** devem ser tratados como soros de teste. O título do reagente de **CONTROLE +** deve ser o mesmo que o título impresso no rótulo do frasco para injetáveis ± uma diluição. Não deve haver qualquer hemaglutinação do **CONTROLE -**. Se a hemaglutinação estiver presente, o teste não é válido.

13 - CAUSAS DE ERRO E LIMITES DE TESTE

- Má conservação do soro.
- Má conservação dos reagentes após a abertura.
- Utilize apenas os conta-gotas fornecidos no kit.
- Não troque os conta-gotas entre os reagentes **R1** e **R2**.
- No caso de uma reação positiva nos primeiros 6 poços, realizar uma diluição em série adicional para determinar o limite de título da hemaglutinação.
- O controle do soro deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controle, será necessário renovar o teste após a eliminação das aglutininas naturais antissépticas do soro por adsorção.
- O controle do reagente deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controle, o ELI.H.A *Schistosoma* não pode ser usado.
- Certos soros, cuja concentração de anticorpos é muito alta, podem dar origem a um fenômeno de zona (com desaparecimento da turvação) nas diluições iniciais, que desaparece nas diluições subsequentes.
- A qualidade dos reagentes permite realizar a reação à noite e ler o teste na manhã seguinte, desde que a microplaca não seja movida de forma alguma e esteja protegida de quaisquer fontes de vibração
- Em todos os casos, é necessário que os dados clínicos, epidemiológicos e biológicos sejam levados em consideração antes de estabelecer o diagnóstico final.

14 - DESEMPENHO

ELI.H.A *Schistosoma* consiste em glóbulos vermelhos sensibilizados por um antígeno *Schistosoma mansoni* altamente purificado, o que garante que este teste de hemaglutinação indireta seja sensível e específico. As avaliações de desempenho de 63 soros positivos (*Schistosoma haematobium* e *mansoni*) e 56 soros negativos apresentaram sensibilidade de 85,7% e especificidade de 98,2%.

15 - ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos devem ser descartados de acordo com as regras de higiene e regulamentos vigentes para este tipo de produto no país de uso. Se o reagente **BUF** for derramado, limpe a área de trabalho com papel absorvente e enxágue com água. Se um soro ou outro reagente for derramado na área de trabalho, limpe usando alvejante e papel absorvente.

16 - BIBLIOGRAFIA

1. S. HOSHINO, M.E.CAMARGO, L.-C. DA SILVA - Padronização de um teste de hemaglutinação para esquistossomose com eritrócitos humanos tratados com formalina - *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 19, N°3, 463/470.
2. A. CAPRON, J. BIGUET, P. TRAN VAN KY, Y. MOSCHETTO - Estudos imunológicos em vários tipos de esquistossomose - *Departamento de Parasitologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Lille, Lille, França*.
3. J. TRIBOULEY, J. TRIBOULEY-DURET, M. APPRIOU, D. BERNARD, R. PAUTRIZEL - Application de la réaction d'hémagglutination passive au diagnostic sérologique de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* - *Bull. Orgão. Seg. Santé*, 1976, vol. 54, 695/702.
4. L. AHMED, A. DODIN - Valeur de la réaction d'hémagglutination passive dans la bilharziose - *Bulletin de la société de Pathologie Exotique*, 1977, N°5, 485/489.
5. P. AMBROISE-THOMAS, R. GRILLOT - L'hémagglutination indirecte dans le diagnostic des bilharzioses. Comparaison à l'immuno-fluorescence indirecte dans l'étude de 3624 sérums humains - *Bulletin de la société de Pathologie Exotique*, 1980, N°3, 277/288.
6. P. WATTRE, M. CAPRON, J.-P. DESSAINT, A. CAPRON - Apport de l'immunologie au diagnostic et au traitement des maladies parasitaires - *Immunologie (II) - R.P.*, 1980, 30, 15.
7. M. EL SAYED AZAB, E. ABBAS EL ZAYAT - Evaluation of purified antigens in haemagglutination test (IHA) for determination of cross reactivities in diagnosis of fascioliasis and schistosomiasis - *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 1996, Vol 26, N°3, 677-685.

ELITech MICROBIO
Parc d'Activités du Plateau
19 Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
04 94 88 55 00
Fax : 04 94 32 82 61