

ELI.H.A Amoeba

Sérodiagnostic de l'amibiase par hémagglutination indirecte

120 tests
(Réf. 66602)

8000100-fr-2012-05



1 - BUT

ELI.H.A Amoeba permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Entamoeba histolytica* par hémagglutination indirecte.

Le coffret permet de réaliser 120 tests ou 20 réactions de 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

L'amibiase ou amébose est une affection parasitaire due à un protozoaire spécifique de l'homme : *Entamoeba histolytica*. Il s'agit de la seule amibe pathogène de l'homme. Le sérodiagnostic permet de confirmer des amibiases d'ordre hépatique et pulmonaire.

3 - PRINCIPE

ELI.H.A Amoeba est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène soluble d'*Entamoeba histolytica*. La présence d'anticorps anti-*Entamoeba histolytica* sériques entraîne une agglutination des hématies sensibilisées qui se traduit par un voile rouge / marron tapissant la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous la forme d'un anneau.

Les hématies non sensibilisées assurent la spécificité de la réaction et permettent d'éliminer les interférences dues aux agglutinines naturelles anti-mouton (hétéroanticorps de Forssman, anticorps de la mononucléose infectieuse...).

La réaction s'effectue en microplaque à fond en U.

La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

4 - REACTIFS ET MATERIEL

Description	Quantité
R1 : flacon de 2,4 mL d'hématies sensibilisées	1
R2 : flacon de 1 mL d'hématies non sensibilisées	1
BUF : flacon de 55 mL de tampon phosphate pH 7,2	1
R3 : flacon de 2 mL d'adsorbant	1
CONTROL + : flacon de 0,2 mL de contrôle positif titré	1
CONTROL - : flacon de 0,2 mL de contrôle négatif	1
MICROPLATE : microplaque à fond en U	2
DROPPER : compte-gouttes spécial	2

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs sont destinés uniquement à un diagnostic *in vitro* et doivent être manipulés par des personnes habilitées.
- Les tests sont à usage unique.
- Tous les réactifs, sauf le réactif **BUF**, contiennent des substances d'origine animale et doivent être manipulés avec les précautions d'usage.
- Les prélèvements sont potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec les précautions d'usage en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1 %).
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant de lots différents.
- Bien attendre que le sérum et les réactifs s'équilibrent à température ambiante.
- Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2** avant utilisation.
- Lors de la distribution des réactifs **R1** et **R2**, veiller à ce que le compte-gouttes soit parfaitement vertical. Vérifier l'absence de bulles d'air dans les gouttes, afin que les volumes délivrés soient constants.

6 - RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Utiliser des sérums frais ou conservés à - 20°C, et ne présentant pas d'hémolyse de trouble ni de contamination.

Eviter les congélations et décongélations répétées.

Ne pas décomplémenter le sérum.

7 - CONSERVATION ET PREPARATION DES REACTIFS

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Tous les réactifs conservés à 2-8°C sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Ils ne doivent pas être congelés.

8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipette(s) automatique(s) au volume de pipetage adapté à la quantité à mesurer ;
- Récipients pour déchets contaminés ;
- Centrifugeuse ;
- Tubes à hémolyse.

9 - MODE OPERATOIRE

Equilibrer les réactifs à température ambiante avant emploi.

9.1 - Préparation de l'échantillon

Diluer le sérum à tester au 1/40 :

- 50 µL de sérum ;
- 1,95 mL de réactif **BUF**.

9.2 - Réalisation du test sur microplaque

- A l'aide d'une micropipette multicanaux, distribuer 50 µL de réactif **BUF** dans 8 cupules de la microplaque.

- A l'aide d'une micropipette, distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 1^{ère} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule, en rejetant 50 µL de la 6^{ème} cupule. On obtient ainsi les dilutions 1/80 jusqu'à 1/2560.

- Distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 7^{ème} cupule.

Mélanger avec le réactif **BUF** et rejeter 50 µL.

Cette dilution (1/80) constitue le témoin sérum, dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums.

- Agiter soigneusement les réactifs **R1** et **R2**.

- Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans les 6 premières cupules.
- Déposer 1 goutte de réactif **R2** dans la 7^{ème} cupule (témoin sérum).
- Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8^{ème} cupule (témoin réactif) dont le rôle est de contrôler la validité du réactif **BUF** et du réactif **R1**.

Remarque : Ne réaliser qu'un seul témoin réactif par série de tests.

- Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules :

- soit manuellement, par tapotements latéraux sur les côtés de la microplaque, posée à plat ;
- soit à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration (par exemple 1300 tours / minute pendant 10 secondes). Ne pas utiliser d'agitateur orbital.

- Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri de toute vibration.

- Lire la réaction 2 heures plus tard.

9.3 - Adsorption des agglutinines naturelles anti-mouton en cas d'agglutination du témoin sérum

- Agiter soigneusement le réactif **R3**.

- Distribuer dans un tube et mélanger :

- 0,1 mL de sérum ;
- 0,3 mL de réactif **R3**.

- Laisser incuber 60 min à température ambiante.

- Centrifuger à 2000 trs/min pendant 15 min.

- Recueillir le surnageant ; le sérum est alors dilué au 1/4.

- Diluer le surnageant au 1/10 dans du réactif **BUF** pour obtenir une dilution mère (1/40) adsorbée.

- Reprendre le protocole de "Réalisation du test sur microplaque" en remplaçant la dilution mère par la dilution mère adsorbée.

10 - LECTURE

Réaction négative : Absence d'hémagglutination.

Présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule.

Réaction positive :

Présence d'hémagglutination.

Présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liséré périphérique.

Exemple : Sérum positif au 1/1280



1/80

1/160

1/320

1/640

1/1280

1/2560

Témoin sérum

Témoin réactif

11 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Titre < 1/80 :

Réaction négative.

Absence probable d'amibiase tissulaire.

1/80 ≤ Titre ≤ 1/160 :

Réaction douteuse.

Un contrôle doit être effectué en utilisant les techniques d'électrosynèse, d'agglutination latex (**ELITex Bicolor Amoeba**) et d'immunofluorescence indirecte.

Titre ≥ 1/320 :

Réaction significative en faveur d'une amibiase viscérale.

12 - CONTROLE QUALITE INTERNE

Les réactifs **CONTROL+** et **CONTROL-** doivent être traités comme les sérums à analyser. Le titre du réactif **CONTROL+** doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à ± une dilution. Le réactif **CONTROL-** doit présenter une absence d'hémagglutination. Si tel n'est pas le cas, le test n'est pas valide.

13 - CAUSES D'ERREURS ET LIMITES DU TEST

- Mauvaise conservation du sérum.
- Mauvaise conservation des réactifs après ouverture.
- Utiliser exclusivement les compte-gouttes fournis dans le coffret.
- Ne pas inter-changer les compte-gouttes entre les réactifs **R1** et **R2**.
- En cas de réaction positive dans les 6 premières cupules, poursuivre les dilutions pour rechercher le titre d'hémagglutination limite.
- Le témoin sérum doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, il est nécessaire de renouveler le test après avoir éliminé les agglutinines naturelles anti-mouton du sérum par adsorption.
- Le témoin réactif doit donner une réaction négative (anneau). En cas d'hémagglutination de ce témoin, le réactif **ELI.H.A Amoeba** n'est pas utilisable.
- Certains sérums, dont la concentration en anticorps est très élevée, peuvent donner lieu à un phénomène de zone (avec rétraction du voile) dans les premières dilutions, qui disparaît dans les dilutions suivantes.
- La qualité des réactifs permet d'exécuter la réaction le soir et d'effectuer la lecture le lendemain matin, à condition que la microplaque ne subisse aucun déplacement et soit à l'abri des vibrations.
- Dans tous les cas et avant l'établissement du diagnostic final, l'interprétation du test doit être réalisée en intégrant l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques et biologiques et des résultats des autres tests.

14 - PERFORMANCES

ELI.H.A Amoeba est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène d'*Entamoeba histolytica*, obtenu par culture axénique. Il assure sensibilité et spécificité à la réaction.

Ainsi, les résultats des évaluations du réactif **ELI.H.A Amoeba** montrent une sensibilité de 93 % et une spécificité de 97 %.

15 - ELIMINATION DES DECHETS

Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de produit dans le pays d'utilisation.

En cas de versement accidentel de réactif **BUF**, nettoyer le plan de travail à l'aide de papier absorbant et rincer avec de l'eau. En cas de versement de sérum ou d'un autre réactif, nettoyer à l'aide d'eau de Javel et de papier absorbant.

16 - BIBLIOGRAPHIE

1. L.-S. DIAMOND - Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae - *J. Parasitol.*, 1968, 54(5), 1047-1056.
2. O. PRAKASH, B.-N. TANDON, I. BHALLA, A.-K. AY, V.-K. VINAYAK - Indirect hemagglutination and ameba-immobilization tests and their evaluation in intestinal and extraintestinal amebiasis - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 18(5), 670-675.
3. M.-N. MORRIS, S.-J. POWELL, R. ELSDON-DUFF - Latex agglutination test for invasive amebiasis - *Lancet*, 1970, 27, (7681), 1362-1363.
4. J. BOS, A.-A. ELIK, P.-A. STEERENBERG - Application of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) in the sero-diagnosis of amebiasis - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69(4), 440.
5. A. VOLLER, D.-E. BIDWELL, A. BARTLETT, R. EDWARDS - A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 71(5), 431-437.
6. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, D. MONGET - Immunoenzyme (ELISA) diagnosis of parasitic diseases using a modified micromethod. Results for toxoplasmosis, amebiasis, trichinosis, hydatidosis and aspergillosis - *Bull. World. Health Organ.*, 1978, 58(5), 797-804.
7. D.-P. HARTMANN, E. GHADIRIAN, E. MEEROVITCH - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) test in the serodiagnosis of experimental hepatic amebiasis - *J. Parasitol.*, 1980, 66(2), 344-345.
8. J.-O. OSISANYA, D.-C. WARHURST - Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 74(5), 605-608.
9. A. TANDON - Use of enzyme linked immunosorbent assay in intestinal and extra-intestinal amebiasis (amoebic liver abscess) - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75(4), 574-575.
10. J.-M. PINON, J. POIRRIEZ, G. REMY, H. LEPAN - Immunological studies in amebiasis: isotopic characterization of specific antibodies by enzyme-linked immunofiltration assay - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 37(2), 290-295.
11. B.-M. GANDHI, M. IRSHAD, T.-C. CHAWLA, B.-N. TANDON - Enzyme linked protein-A : an ELISA for detection of amoebic antibody - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81(2), 183-185.
12. R. ROBERT, C. MAHAJZA, C. BERNARD, C. BUFFARD, J.-M. SENET - Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amebiasis - *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(6), 1422-1424.

ELITech MICROBIO

Parc d'Activités du Plateau

19 Allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

☎ : 04 94 88 55 00

Fax : 04 94 88 55 22



Sero diagnosis of amoebiasis

ELIHA Amoeba

by indirect haemagglutination

120 tests

(Ref. 66602)

8000100-6n-2012-05

1 - AIM
ELIHA Amoeba enables the quantitative determination of anti-*Entamoeba histolytica* serum antibodies by indirect haemagglutination.

2 - INTRODUCTION
 Amoebiasis is a parasitic infection caused by a protozoon specific to man: *Entamoeba histolytica*. It is the only pathogenic amoeba of man. Serodiagnosis enables the confirmation of hepatic and pulmonary amoeba infections.

3 - PRINCIPLE
 ELIHA Amoeba is based on the indirect haemagglutination principle. The sensitized red blood cells consist of sheep red blood cells covered with an *Entamoeba histolytica* antigen. The presence of anti-*Entamoeba histolytica* serum antibodies results in agglutination of the sensitized red blood cells resulting in a cloudy red/brown deposit coating the well. In the absence of specific antibodies, the red blood cells form a ring-like deposit at the bottom of the well. The non-sensitized red blood cells ensure the specificity of the reaction making it possible to eliminate any interference from the natural anti-sheep agglutinins (Forsman heteroantibodies, infectious mononucleosis antibodies,...). The reaction is carried out in a U-microplate. Handling is simple and fast, with results within 2 hours.

Description	Quantity
R1: Vial of 2.4 mL of sensitized red blood cells	1
R2: Vial of 1 mL of non-sensitized red blood cells	1
BUF: Vial of 55 mL of phosphate buffer pH 7.2	1
R3: Vial of 2 mL of adsorbent	1
CONTROL +/-: Vial of 0.2 mL of titrated positive control	1
CONTROL -: Vial of 0.2 mL of negative control	1
MICROPLATE: Microplate with a U-bottom	2
DROPPER: Special dropper	2

5 - PRECAUTIONS
 The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only and must be handled by authorized personnel.
 - Tests are for single use only.
 - All the reagents, except the BUF reagent, contain raw materials of animal origin and must be handled with caution.
 - Patient samples are potentially infectious. They must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.
 - The reagents contain sodium azide (<0.1%).
 - Do not use reagents after the expiry date.
 - Do not use reagents from different batch numbers.
 - Carefully shake the R1 and R2 reagents before use.
 - When dispensing the R1 and R2 reagents, make sure that the dropper is perfectly vertical. Check for the absence of air bubbles in the drops to ensure constant delivery volumes.

6 - SAMPLE COLLECTION AND TREATMENT
 Use fresh serum or serum preserved at -20°C, and not showing any sign of haemolysis, cloudiness or contamination.
 Avoid repeated freezing and defrosting.
 Do not decontaminate the serum.
7 - STABILITY, STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS
 All the reagents stored at 2-8°C, in their original packaging, are stable until the expiry date indicated on the box. Do not freeze.
 The reagents are ready-to-use.

- 8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**
- Automatic pipette(s) with a pipetting volume adapted to the volume that will be measured;
 - Contaminated waste containers;
 - Centrifuge;
 - Haemolysis tubes.
- 9 - METHOD**
- Allow the reagents to reach room temperature before use.
- 9.1 - Sample preparation**
 Carry out a 1:40 dilution of the serum to be tested:
- 50 µL of serum;
 - 1.95 mL of BUF reagent.
- 9.2 - Realization of the test on a microplate**
- Using a multichannel microplate, add 50 µL of BUF reagent to 8 wells of the microplate.
 - Add 50 µL of diluted serum to the 7th well.
 - Mix the serum with the BUF reagent and then discard 50 µL. This dilution (1:80) is the serum control, whose role is to detect the natural anti-sheep agglutinins that could be present in certain serum samples.
 - Carefully shake the R1 and R2 reagents.
 - Add 1 drop of R1 reagent to the first 6 wells.
 - Add 1 drop of R2 reagent to the 7th well (serum control).
 - Add 1 drop of R1 reagent to the 8th well (reagent control) whose role is to control the validity of the BUF and R1 reagent.

- 9.3 - Adsorption of the natural anti-sheep agglutinins in the event of agglutination of the serum control**
- Carefully shake the R3 reagent.
 - In a tube, add and mix:
 - 0.1 mL of serum;
 - 0.3 mL of R3 reagent.
 - Incubate at room temperature for 60 minutes.
 - Centrifuge at 2000 rpm for 15 minutes.
 - Collect the supernatant; the serum is now at a 1:4 dilution.
 - Carry out a 1:10 dilution of the supernatant in BUF reagent to obtain an adsorbed stock dilution (1:40).
 - Follow the steps described in "Realization of the test on a microplate", but replace the stock dilution by the adsorbed stock dilution.
- 10 - READING**
- Negative reaction:**
 Absence of haemagglutination.
 Presence of a more or less large ring at the bottom of the well.
- Positive reaction:**
 Presence of a cloudy red/brown deposit coating the well, sometimes there is the presence of a fine peripheral border.
- Example: Serum positive at a dilution of 1:280



Titer < 1/80 :
 Negative reaction
 Probable absence of amoeba tissue infection.

1:80 < Titer < 1:160:
 Doubtful reaction.
 A control must be carried out with the electroimmersion technique, and indirect latex agglutination technique (ELITex Bicolor Amoeba) and indirect immunofluorescence.

Titer ≥ 1:320:
 Significant reaction in favour of visceral amoebiasis.

12 - INTERNAL QUALITY CONTROL
 The CONTROL + and CONTROL - reagents must be treated like test serums. The titer of the CONTROL + reagent must be the same as the titer printed on the vial label ± one dilution. There must not be any haemagglutination of the CONTROL -. If haemagglutination is present then the test is not valid.

13 - CAUSES OF ERROR AND TEST LIMITS

- Poor conservation of the serum.
- Poor conservation of the reagents.
- In the case of a positive reaction in the first 6 wells, carry out a further serial dilution in order to determine the titer limit of haemagglutination.
- The serum control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, it will be necessary to renew the test after having eliminated the natural anti-sheep agglutinins from the serum by adsorption.
- The reagent control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, the ELIHA Amoeba cannot be used.
- Certain serums, whose antibody concentration is very high, can give rise to a zone phenomenon (with disappearance of the clouding) in the initial dilutions, which disappears in the subsequent dilutions.
- The quality of the reagents makes it possible to carry out the reaction in the evening and to read the test the following morning, provided that the microplate is not moved in any way and is protected from any sources of vibration.
- In all cases, it is necessary that the clinical, epidemiologic and biological data are taken fully into consideration before establishing the final diagnosis.

14 - PERFORMANCE
 ELIHA Amoeba consists of red blood cells sensitized with an *Entamoeba histolytica* antigen, obtained by aseptic culture, that ensures the specificity and sensitivity of the reaction. Evaluation has demonstrated that the test ELIHA Amoeba has a sensitivity of 93 % and a specificity of 97 %.

15 - WASTE ELIMINATION
 Waste should be disposed of in accordance with the hygiene rules and current regulations for this kind of product in the country of use.
 If the BUF reagents is spilled, clean the work area with absorbent paper and rinse with water.
 If a serum or another reagent is spilled on the work area, clean using bleach and absorbent paper.

- L. S. DIAMOND - Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amoebae - *J. Parasitol.*, 1968, 54(5), 1047-1056.
 - O. PRAKASH, B.-N. TANDON, I. BHALLA, A.-K. ARY, V.-K. VINAYAK - Indirect hemagglutination and amoeba-immobilization tests and their evaluation in intestinal and extraintestinal amoebiasis - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 18(5), 670-675.
 - M.-N. MORRIS, S.-J. POWELL, R. ELSDON-DEW - Latex agglutination test for invasive amoebiasis - *Lancet*, 1970, 27, 1(7661), 1362-1363.
 - J. BOS, A.-A. EIJK, P.-A. STEERENBERG - Application of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) in the sero-diagnosis of amoebiasis - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69(4), 440.
 - A. VOLTER, D.-E. BIVWELL, A. BARTLETT, R. EDWARDS - A comparison of isotope and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 71(5), 431-437.
 - P. AMROISE-TIHOUMAS, P.-T. DESGEORGES, D. MONGET - Immunoenzyme (ELISA) diagnosis of parasitic diseases using a modified micro-method. Results for toxoplasmosis, amoebiasis, trichinosis, hydatidosis and aspergillosis - *Bull. World Health Organ.*, 1978, 56(5), 797-804.
 - D. P. HARTMANN, E. GHADIRIAN, E. MEEROVITCH - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) test in the serodiagnosis of experimental hepatic amoebiasis - *J. Parasitol.*, 1980, 66(2), 344-345.
 - O. SISSANVA, D.-C. WARRHURST - Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitation *Entamoebiasis* - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 74(5), 605-608.
 - A. TANDON - Use of enzyme linked immunosorbent assay in intestinal and extra-intestinal amoebiasis (amoebiasis) - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75(4), 574-575.
 - J.-M. PINON, J. POHRIEZ, G. KENY, H. LEFAN - Immunological studies in amoebiasis: isotypic characterization of specific antibodies by enzyme-linked immunotitration assay - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 37(2), 290-295.
 - B.-M. GANDHI, M. IRSHAD, T.-C. CHAWLA, B.-N. TANDON - Enzyme linked protein-A - an ELISA for detection of amoebic antibody - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81(2), 183-185.
 - R. ROBERT, C. MAHAZ, C. BERNARD, C. BUFFARD, J.-M. SENEZ - Evaluation of a new color latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis - *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(6), 1422-1423.
- Parc d'Activités du Plateau
 19 Allée d'Athènes
 83870 SIGNES
 FRANCE
 Fax : 04 94 88 55 22
 : 04 94 88 55 00

