

ELI.H.A Amoeba

Serodiagnose van amoebiasis door indirecte hemagglutinatie

120 testen
(Ref. 66602)

8000100-DU-2012-05

Alleen voor diagnostisch gebruik *in vitro*, alleen voor professioneel gebruik.
Tests voor eenmalig gebruik.



1 - DOEL

ELI.H.A Amoeba maakt de kwantitatieve bepaling mogelijk van serumantilichamen gericht tegen *Entamoeba histolytica* door indirecte hemagglutinatie. Met de kit kunnen 120 testen of 20 reacties van 6 verdunningen worden uitgevoerd.

2 - INLEIDING

Amoebiasis of entamoebiasis is een parasitaire ziekte als gevolg van een specifiek protozoan bij de mens: *Entamoeba histolytica*. Het is de enige menselijke pathogene amoëbe. De serodiagnose maakt het mogelijk om de lever- en longamoebiasis te bevestigen.

3 - PRINCIPE

ELI.H.A Amoeba is gebaseerd op het principe van indirecte hemagglutinatie. De gesensibiliseerde rode bloedcellen bestaan uit rode bloedcellen van schapen bedekt met een oplosbaar antigeen *Entamoeba histolytica*. De aanwezigheid van serumantilichamen tegen *Entamoeba histolytica* zorgt ervoor dat gesensibiliseerde rode bloedcellen samenklonteren, wat resulteert in een rood/bruine sluis die de cupula bedekt. Bij gebrek aan specifieke antilichamen bezinken deze rode bloedcellen op de bodem van de cupula in de vorm van een ring.

De niet-gesensibiliseerde rode bloedcellen zorgen voor de specificiteit van de reactie en maken de eliminatie mogelijk van de interferenties door natuurlijke antischaap-agglutinenen (Forssmans hetero-antilichamen, antilichamen van infectieuze mononucleose, etc.).

De reactie vindt plaats in een U-vormige microtiterplaat. De hantering is snel en eenvoudig. Resultaten worden verkregen in 2 uur.

4 - REAGENTIA EN MATERIAAL

Beschrijving	Aantal
R1 : flacon van 2,4 mL met gesensibiliseerde rode bloedcellen	1
R2 : flacon van 1 mL met niet-gesensibiliseerde rode bloedcellen	1
BUF : flacon van 55 mL fosfaatbuffer pH 7,2	1
R3 : flacon van 2 mL adsorbens	1
CONTROL + : flacon van 0,2 mL van getitreerde positieve controle	1
CONTROL - : flacon van 0,2 mL van negatieve controle.	1
MICROPLATE : U-vormige microtiterplaat	2
DROPPER : speciale druppelaar	2

5 - VOORZORGEN BIJ GEBRUIK

- Reagentia zijn alleen bedoeld voor *in-vitro*-diagnose en dienen door geautoriseerd personeel te worden gehanteerd.
- De testen zijn voor eenmalig gebruik.
- Alle reagentia, behalve het reagens **BUF**, bevatten stoffen van dierlijke oorsprong en dienen voorzichtig te worden gehanteerd.
- De monsternemingen zijn potentieel besmettelijk. Ze moeten worden gehanteerd met de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen en met inachtneming van de in het land van gebruik geldende hygiënevoorschriften.
- De reagentia bevatten natriumazide (concentratie <0,1%).
- Gebruik reagentia niet langer dan de vervaldatum.
- Gebruik geen reagentia uit verschillende batches.
- Wacht tot het serum en de reagentia op kamertemperatuur komen.
- Schud de reagentia **R1** en **R2** voorzichtig vóór gebruik.
- Bij het toedienen van reagentia **R1** en **R2** moet ervoor worden gezorgd dat de druppelaar perfect verticaal staat. Controleer of er geen luchtbellen in de druppels zitten, zodat de geleverde volumes constant zijn.

6 - VERZAMELING EN VERWERKING VAN MONSTERS

Gebruik verse serums of serums die bij - 20 °C bewaard worden en die geen troebele hemolyse of verontreiniging vertonen. Voorkom herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Het serum nooit decomplexeren.

7 - OPSLAG EN BEREIDING VAN REAGENTIA

De reagentia zijn klaar voor gebruik.

Alle reagentia die bij 2-8 °C worden bewaard, zijn stabiel tot de op de verpakking vermelde uiterste gebruiksdatum. Zij mogen niet worden bevroren.

8 - BENODIGD, MAAR NIET MEEGELIJDIG MATERIAAL

- Automatische pipet(ten) met een aan de te meten hoeveelheid aangepast pipetteringsvolume;
- Containers voor verontreinigd afvalmateriaal;
- een centrifuge;
- Hemolysebuisjes.

9 - WERKWIJZE

Laat reagentia vóór gebruik op kamertemperatuur komen.

9.1 - Voorbereiding van het monster

Verdun het te testen serum tot 1/40:

- 50 µL serum;
- 1,95 mL van reagens **BUF**.

9.2 - Uitvoering van de test op microtiterplaat

- Breng met behulp van een meerkanale micropipet 50 µL reagens **BUF** in 8 putjes van de microtiterplaat.

- Breng met behulp van een micropipet 50 µL van het verdunde serum in het 1^e putje. Meng met het reagens **BUF** en breng, bij voorkeur met behulp van een microverdunner ("tulp"), 50 µL van het 1^e putje in het 2^e putje, van het 2^e putje in het 3^e, en ga zo maar door tot het 6^e putje, waarbij 50 µL van het 6^e putje wordt weggegooid. Dat resulteert in verdunningen van 1/80 tot 1/2560.

- Breng 50 µL van het verdunde serum over in het 7^e putje. Meng met het reagens **BUF** en gooi 50 µL weg. Deze verdunning (1/80) vormt de serumcontrole die tot taak heeft de natuurlijke antischaapagglutinenen die bepaalde serums kunnen bevatten, op te sporen.

- Schud de reagentia **R1** en **R2** voorzichtig.

- Breng 1 druppel reagens **R1** in de eerste 6 putjes.
- Plaats 1 druppel reagens **R2** in het 7^e putje (serumcontrole).
- Breng 1 druppel reagens **R1** in het 8^e putje (reagentiacontrole) die tot taak heeft de validiteit van het reagens **BUF** en het reagens **R1** te controleren.

Opmerking: voer slechts één reagentiacontrole uit per testreeks.

- Homogeniseer de inhoud van de putjes zeer zorgvuldig:

- ofwel met de hand, door te tikken op de zijkanen van de plat gepositioneerde microtiterplaat;
 - ofwel door middel van een trilroeder voor microtiterplaten (bijvoorbeeld 1300 omw/min gedurende 10 seconden). Gebruik geen ronde roerder.
- Laat de plaat vervolgens onbeweeglijk en volledig trillingsvrij liggen.

- Lees de reactie 2 uur later.

9.3 - Adsorptie van natuurlijke antischaapagglutinenen in geval van agglutinatie van de serumcontrole

- Schud het reagens **R3** voorzichtig.
- Plaats het in een buisje en meng het:
 - 0,1 mL serum;
 - 0,3 mL reagens **R3**.
- Laat 60 min incuberen bij kamertemperatuur.
- Centrifugeer bij 2000 omw/min gedurende 15 min.
- Verzamel het supernatant; het serum wordt vervolgens verdund tot 1/4.
- Verdun het supernatant tot 1/10 in reagens **BUF** om een geadsorbeerde moederverdunning (1/40) te verkrijgen.
- Herhaal het protocol van "Uitvoering van de test op microtiterplaat" en vervang de moederverdunning door de geadsorbeerde moederverdunning.

10 - AFLEZING

Negatieve reactie:

Afwezigheid van hemagglutinatie.

Aanwezigheid van een min of meer brede ring aan de onderkant van het putje.

Positieve reactie:

Aanwezigheid van hemagglutinatie.

Aanwezigheid van een rode/bruine sluis die het putje bedekt; aanwezigheid van een dunne perifere strook.

Voorbeeld: serum positief op 1/1280



11 - INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Titer < 1/80:

negatieve reactie.

Waarschijnlijk afwezigheid van wefelselamoebiasis.

1/80 ≤ Titer ≤ 1/160:

Onbetrouwbare reactie.

Een controle moet worden uitgevoerd met behulp van elektrolysestechnieken, latex agglutinatie technieken (**ELITex Bicolor Amoeba**) en technieken van indirecte immunofluorescentie.

Titer > 1/320:

aanzienlijke reactie ten voordele van viscerale amoebiasis.

12 - INTERNE KWALITEITSCONTROLE

De reagentia **CONTROL+** en **CONTROL-** moeten tijdens de analyse als serums worden behandeld. De titer van het reagens **CONTROL+** moet gelijk zijn aan de titer vermeld op het etiket van de flacon bij ± een verdunning. Het reagens **CONTROL-** moet een afwezigheid van hemagglutinatie vertonen. Als dat niet het geval is, is de test niet geldig.

13 - OORZAKEN VAN FOUTEN EN BEPERKINGEN VAN DE TEST

- Slechte opslag van het serum.
- Slechte opslag van reagentia na opening.
- Gebruik alleen de meegeleverde druppelaars in de kit.
- Wissel de druppelaars niet uit tussen de reagentia **R1** en **R2**.
- Bij een positieve reactie in de eerste 6 putjes, dient u verder te gaan met de verdunningen om te zoeken naar de limiethemagglutinatietiter.
- De serumcontrole moet een negatieve reactie geven (ring). In geval van hemagglutinatie van deze controle moet de test worden herhaald nadat de natuurlijke antischaapagglutinenen door adsorptie uit het serum zijn verwijderd.
- De reagentiacontrole moet een negatieve reactie geven (ring). In geval van hemagglutinatie van deze controle, is het reagens **ELI.H.A Amoeba** niet bruikbaar.
- Sommige serums, waarvan de concentratie van antilichamen zeer hoog is, kunnen bij de eerste verdunningen een zonefenomeen (met retractie van de sluis) veroorzaken, dat bij de volgende verdunningen verdwijnt.
- De kwaliteit van de reagentia maakt het mogelijk om de reactie 's avonds uit te voeren en de aflezing de volgende ochtend, op voorwaarde dat de microtiterplaat niet wordt verplaatst en tegen trillingen wordt beschermd.
- In alle gevallen, en voordat de definitieve diagnose wordt gesteld, moet de interpretatie van de test worden gerealiseerd met de integratie van alle klinische, epidemiologische en biologische gegevens en de resultaten van andere tests.

14 - PRESTATIES

ELI.H.A Amoeba bestaat uit rode bloedcellen gesensibiliseerd door een antigeen van *Entamoeba histolytica*, verkregen door axene cultuur (een cultuur vrij van saprofytische of pathogene kiemen). Dat garandeert gevoeligheid en specificiteit voor de reactie.

De resultaten van de evaluaties van het reagens **ELI.H.A Amoeba** tonen dus een gevoeligheid van 93% en een specificiteit van 97%.

15 - AFVALVERWIJDERING

Afval dient te worden afgevoerd in overeenstemming met de in het land van gebruik voor dit type product geldende hygiënevoorschriften en wetgeving.

In geval van accidenteel morsen van reagens **BUF**: het werkkoppervlak reinigen met absorberend papier en spoelen met water. Als er serum of een ander reagens gemorst wordt: reinigen met bleekmiddel en absorberend papier.

16 - BIBLIOGRAFIE

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-DEW - Latex agglutination test for invasive amoebiasis - *Lancet*, 1970, 27,1(7661), 1362-1363.
4. 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.
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. DESGEOURDES, 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, 56(5), 797-804.
7. D.-P. HARTMANN, E. GHADRARIAN, 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 amoebiasis (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. MAHAZA, C. BERNARD, C. BUFFARD, J.-M. SENET - Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amoebiasis - *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(6), 1422-1424.

De wijzigingen ten opzichte van de vorige versie zijn grijs gemarkeerd.

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

