


ELI.H.A Amoeba

Sérodiagnostic de l'amibiase par hémagglutination indirecte

120 Tests

(Réf. 66602)

8000100-FR-2025-07
Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement.
Test à usage unique.



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 sédimenter 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 mononuclease infectieuse...). La réaction s'effectue en microplaque à fond en U. La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

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%). L'azide de sodium contenu dans les réactifs peut réagir avec les métaux lourds des canalisations pour former des composés explosifs. Il est donc recommandé de ne pas jeter les réactifs à l'évier et de suivre les recommandations et réglementations d'élimination des déchets en vigueur.
- 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.
Éviter 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
Équilibrer 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 1ère cupule.
Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1ère cupule dans la 2ème, de la 2ème dans la 3ème, et ainsi de suite jusqu'à la 6ème cupule, en rejetant 50 µL de la 6ème cupule.
On obtient ainsi les dilutions 1/80 jusqu'au 1/2560.

- Distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 7ème 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 **R2** dans les 6 premières cupules.
• Déposer 1 goutte de réactif **R2** dans la 7ème cupule (témoin sérum).
• Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8ème 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.

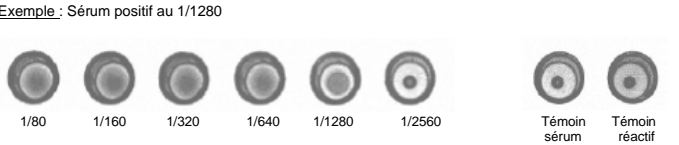
- Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules :
• soit manuellement, par tapotements latéraux sur les côtés de la microplaque, posée à plat ;
• soit à l'aide d'un agitateur vibreur pour plaques à microtitration (par exemple 1300 tours / minute pendant 10 secondes). Ne pas utiliser d'agitateur 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 postive : **Présence d'hémagglutination.**
Présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liseré périphérique.



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, il est nécessaire 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-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. 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, 56(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 amoebiasis (amebic 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: isotypic 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.