

ELI.H.A Amoeba

Sierodiagnosi dell'amebiasi tramite emoaagglutinazione indiretta

120 Tests
(Ref. 66602)

8000100-IT-2012-05

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



1 - SCOPO

ELI.H.A Amoeba consente la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-*Entamoeba histolytica* in campioni di siero tramite emoaagglutinazione indiretta. Il kit consente di eseguire 120 test o 20 reazioni di 6 diluizioni.

2 - INTRODUZIONE

L'amebiasi o amebosi è una condizione parassitaria causata da uno specifico protozoo umano: *Entamoeba histolytica*. È l'unica ameba patogena dell'uomo. La sierodiagnosi lo consente per confermare l'amebiasi epatica e polmonare.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A Amoeba si basa su emoaagglutinazione indiretta. Eritrociti sensibilizzati sono composti di eritrociti di pecora rivestiti con un antigene endogeno *Entamoeba histolytica* solubile. La presenza degli anticorpi anti-*Entamoeba histolytica* in campioni di siero è rivelata da un'agglutinazione dei eritrociti sensibilizzati: una pellicola rossiccia-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 micropietra a U.

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

4 - CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

Descrizione	Quantità
R1: Fiala di 2,4 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 assorbente	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.
- I reagenti contengono sodio azide (con una concentrazione 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 micropietra

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

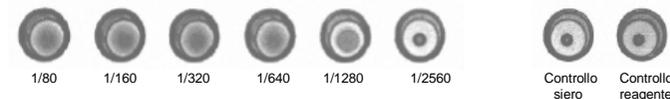
- Agitare con cautela il reagente **R3**.
- Introdurre in un tubo e mescolare:
 - 0,1 mL di siero test;
 - 0,3 mL di reagente **R3**.
- Incubare per 60 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 giri/min per 15 min.
- Raccogliere il fluido supernatante; il siero quindi è diluito 1/4.
- Diluire 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 micropietra" 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 più o meno ampio

Reazione positiva: **Emoaagglutinazione**
Presenza di una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto; talvolta, la presenza di un anello periferico sottile

Esempio: siero positivo a 1/2560



11 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Titolo < 1/80: **Reazione non significativo.**
Probabile assenza di amebiasi profonda.

1/80 ≤ Titolo ≤ 1/160: **Reazione equivoco.**
Il controllo deve essere eseguito utilizzando electrosyneresis, agglutinazione al lattice (**ELITex Bicolor Amoeba**) e le tecniche di immunofluorescenza indiretta.

Titolo ≥ 1/320: **Reazione significativo a favore di amebiasi viscerale.**

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 Amoeba** 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 siera, con lettura la mattina successiva, purché la micropietra 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 Amoeba è composto dei eritrociti sensibilizzati da un antigene *Entamoeba histolytica*, ottenuto dalla cultura axenic e che assicura sensibilità e specificità per la reazione. Quindi, i risultati delle valutazioni di **ELI.H.A Amoeba** mostrano una sensibilità del 93% ed una specificità del 97%.

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

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 amebiasis - *Lancet*, 1970, 27,1(7661), 1362-1363.
4. J. BOS, A.-A. ELJK, 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, 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-amebic 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 (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: 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 amebic 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 amebiasis - *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(6), 1422-1424.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎Tel: +33 (0) 4 94 88 55 00
Fax: +33 (0) 4 94 32 82 61
http://www.elitechgroup.com

