

ELI.H.A Amoeba

Serodiagnóstico da amebiase por hemaglutinação indireta

120 Testes

(Ref. 66602)

8000100-PT-2012-05

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



1 - OBJETIVO

ELI.H.A Amoeba permite a determinação quantitativa de anticorpos séricos contra *Entamoeba histolytica* por hemaglutinação indireta.

O kit pode ser usado para 120 testes ou 20 reações com 6 diluições.

2 - INTRODUÇÃO

Amoebíase ou entamoebíase é uma doença parasitária devido a um certo protozoário em humanos: *Entamoeba histolytica*. É a única ameba patogênica humana. O serodiagnóstico torna possível confirmar a amebíase hepática e pulmonar.

3 - PRINCÍPIO

O ELI.H.A Amoeba baseia-se no princípio da hemaglutinação indireta. Os glóbulos vermelhos sensibilizados consistem em glóbulos vermelhos de ovelhas revestidas com o antígeno solúvel *Entamoeba histolytica*. A presença de anticorpos séricos contra *Entamoeba histolytica* faz com que os glóbulos vermelhos sensibilizados se aglutinem, resultando em um véu vermelho/marrom cobrindo a depressão. Na ausência de anticorpos específicos, esses glóbulos vermelhos se estabelecem na forma de um anel no fundo da depressão.

Os glóbulos vermelhos não sensibilizados fornecem a especificidade da reação e permitem a eliminação da interferência por aglutininas naturais antissépticas (heteroanticorpos de Forssman, anticorpos contra mononucleose infecciosa, etc.).

A reação ocorre numa placa de microtitulação em forma de U.

O manuseio é rápido e fácil. Os resultados são obtidos em apenas 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 com controle positivo titulado	1
CONTROLE - : frasco de 0,2 ml com controle negativo.	1
MICROPLACA : placa de microtitulação em forma de U	2
CONTA-GOTAS : gotejador especial	2

5 - PRECAUÇÕES DE USO

- Os reagentes são apenas para diagnóstico *in vitro* e devem ser manuseados por pessoal autorizado.
- Os ensaios destinam-se a utilização única.
- Todos os reagentes, exceto o reagente **BUF**, contêm substâncias de origem animal e devem ser tratados com cautela.
- As amostras podem ser contagiosas. Eles devem ser tratados com as precauções usuais e de acordo com os regulamentos de higiene do país de uso.
- Os reagentes contêm azida sódica (concentração <0,1%).
- Não use reagentes após a data de validade.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Aguarde até que o soro e os reagentes atinjam a temperatura ambiente.
- Agite suavemente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.
- Ao administrar os reagentes **R1** e **R2**, deve-se garantir antecipadamente que o conta-gotas esteja perfeitamente vertical. Certifique-se de que não há bolhas de ar nas gotículas para que as quantidades entregues sejam constantes.

6 - COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Use soros frescos ou soros que tenham sido armazenados a -20 ° C e não apresentem hemólise ou contaminação turva. Evite o congelamento e descongelamento repetidos. Nunca divida o soro em seus componentes individuais.

7 - ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Os reagentes estão prontos para uso.

Todos os reagentes armazenados a 2-8°C são estáveis até o prazo de validade indicado na embalagem. Não devem ser congelados.

8 - MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO INCLuíDO

- Pipeta(s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado (s) à quantidade a ser medida;
- Recipientes de resíduos contaminados;

- Centrifugadora
- Tubos de hemólise.

9 - MÉTODO

Deixe os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de usar.

9.1 - Preparação da amostra

Diluir o soro a ser testado para 1/40:

- 50 µl de soro;
- 1,95 ml de reagente **BUF**.

9.2 - Realização do teste em placa de microtitulação

- Transfira 50 µl de reagente **BUF** para 8 poços da placa de microtitulação com uma micropipeta multicanal.
- Transferir 50 µl do soro diluído para o primeiro enrijecimento com uma micropipeta. Misture com o reagente **BUF** e, de preferência com o auxílio de um microestanho "em forma de tulipa", transfira 50 µl da primeira depressão para o segundo reforço, do segundo reforço para o terceiro reforço e assim por diante até a sexta depressão, 50 µl da sexta depressão sendo jogados fora. Isso leva a diluições de 1/80 a 1/2560.
- Transferir 50 µl do soro diluído para o sétimo reforço. Misturar **BUF** com o reagente e descartar 50 µL. Esta diluição (1/80) representa o controle do soro, cuja tarefa consiste em detectar as aglutininas naturais antivegetativas, que podem conter determinados soros.
- Agitar cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2**.
 - Transfira uma gota do reagente **R1** para os primeiros 6 poços.
 - Transferir uma gota do reagente **R2** para o sétimo reforço (controle do soro).
 - Transfira uma gota do reagente **R1** para o oitavo reforço (controle do reagente) usado para verificar a validade do reagente **BUF** e do reagente **R1**.

Nota: Realize apenas uma verificação de reagente por série de testes.

- Homogeneize o conteúdo dos poços com muito cuidado:
 - manualmente, batendo nos lados da placa de microtitulação posicionada de forma plana;
 - ou por meio de um agitador de vibração de placa de microtitulação (por exemplo, 1300 rpm por uma duração de 10 segundos). Não use um agitador redondo.
- Em seguida, deixe a placa imóvel e completamente livre de vibrações.
- Leia a reação 2 horas depois.

9.3 - Adsorção de aglutininas naturais antissépticas durante a aglutinação do controle sérico

- Agitar cuidadosamente o reagente **R3**.
- Colocar num tubo e misturar com:
 - 0,1 ml de soro;
 - 0,3 ml de reagente **R3**
- Deixe incubar à temperatura ambiente por 60 minutos.
- Centrifugue por 15 minutos a 2000 rpm.
- Recolher o sobrenadante cultural. O soro é então diluído para 1/4.
- Diluir o sobrenadante da cultura no reagente **BUF** a 1/10 para obter uma diluição mãe adsorvida (1/40).
- Replta o protocolo " Realização do teste em placa de microtitulação " e substitua a diluição mãe pela diluição mãe adsorvida.

10 - LER

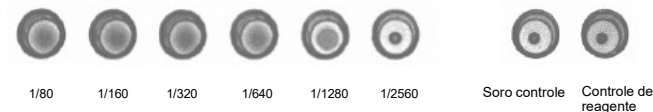
Reação negativa: Sem hemaglutinação.

Presença de um anel mais ou menos largo na parte inferior da depressão.

Reação positiva: Presença de hemaglutinação.

Presença de um véu vermelho/marrom cobrindo a depressão; presença de uma fina faixa circunferencial.

Exemplo: soro positivo a 1/1280



11 - INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Título <1/80: reação negativa.

Provável ausência de amebíase tecidual.

1/80 ≤ Título ≤ 1/160: Reação não confiável.

Um controle deve ser realizado usando técnicas de eletrossíntese e técnicas de aglutinação de látex (ELITex Bicolor Amoeba) e técnicas de imunofluorescência indireta.

Título ≥ 1/320: resposta significativa em favor da amebíase visceral.

12 - CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

Os reagentes **CONTROLE +** e **CONTROLE -** devem ser tratados como soro durante a análise. O título do reagente **DE CONTROLE +** deve ser o título indicado no rótulo do frasco para injetáveis a ± uma diluição. O **CONTROLE -** reagente não deve ter qualquer hemaglutinação. Se este não for o caso, o teste é inválido.

13 - CAUSAS DE ERROS E LIMITAÇÕES DO TESTE

- Armazenamento deficiente do soro.
- Armazenamento deficiente de reagentes após a abertura.
- Use apenas os conta-gotas incluídos no kit.
- Não substitua os conta-gotas entre os reagentes de **R1** e **R2**.
- Se a reação for positiva nos primeiros 6 poços, proceder às diluições para determinar o valor-limite para o título de hemaglutinação.
- O controle do soro deve resultar numa reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controle, o teste deve ser repetido após a remoção das aglutininas naturais antissépticas do soro por adsorção.
- O controle do reagente deve resultar numa reação negativa (anel). No caso de hemaglutinação neste controle, é um reagente ELI.H.A Amoeba, que não pode ser usado.
- Alguns soros, cuja concentração de anticorpos é muito alta, podem causar um fenômeno de zona (com retração do véu) nas primeiras diluições, que desaparece com as seguintes diluições.
- A qualidade dos reagentes permite realizar a reação à noite e lê-la na manhã seguinte, desde que a placa de microtitulação não seja movida e esteja protegida das vibrações.
- Em todos os casos e antes do diagnóstico final, a interpretação do teste deve incluir todos os dados clínicos, epidemiológicos e biológicos e os resultados de outros testes.

14 - SERVIÇOS

ELI.H.A Amoeba consiste em glóbulos vermelhos sensibilizados por um antígeno de *Entamoeba histolytica* e obtidos por cultura de machados (uma cultura livre de germes saprófitos ou patogênicos). Isso garante sensibilidade e especificidade para a reação.

Os resultados das avaliações do reagente ELI.H.A Amoeba mostram, assim, uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97%.

15 - ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos devem ser descartados de acordo com os regulamentos e leis de higiene que se aplicam a este tipo de produto no país de uso.

Em caso de derramamento acidental do reagente **BUF**: Limpar a superfície de trabalho com papel absorvente e enxaguar com água. Se o soro ou outro reagente for derramado: limpe com alvejante e papel absorvente.

16 - BIBLIOGRAFIA

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 - Testes indiretos de hemaglutinação e imobilização de amebas e sua avaliação na amebíase intestinal e extraintestinal - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 18(5), 670-675.
3. M.-N. MORRIS, S.-J. POWELL, R. ELSDON-DEW - Teste de aglutinação de látex para amebíase invasiva - *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 soro-diagnosis of amoebiasis - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69(4), 440.
5. A. VOLL, D.-E. BIDWELL, A. BARTLETT, R. EDWARDS - Uma comparação de imunossaios isotópicos e enzimáticos para doenças parasitárias tropicais - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 71(5), 431-437.
6. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, D. MONGET - Diagnóstico de imunoenzimas (ELISA) de doenças parasitárias usando um micrométodo modificado. Resultados para toxoplasmosse, amebíase, triquinose, hidatidose e aspergilose - *Bull. Mundo. Health Organ.*, 1978, 56(5), 797-804.
7. D.-P. HARTMANN, E. Ghadrian, E. MEEROVITCH - Ensaio de imunoborção enzimática (ELISA) e teste de hemaglutinação indireta (IHA) no serodiagnóstico de amebíase hepática experimental - *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 - Uso de ensaio imunoenzimático na amebíase intestinal e extra-intestinal (abscesso hepático amebiano) - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75(4), 574-575.
10. J.-M. PINON, J. POIRRIEZ, G. REMY, H. LÉPAN - Immunological studies in amoebiasis: 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.

As alterações em comparação com a versão anterior são destacadas em cinza.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19 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

