

ELI.H.A *Echinococcus*

Sierodiagnosi di idatidosi tramite emoagglutinazione indiretta

102 Tests

(Ref. 66604)

8000140-IT-2012-01

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



1 - SCOPO

ELI.H.A *Echinococcus* consente la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-*Echinococcus granulosus* in campioni di siero tramite emoagglutinazione indiretta. Il kit consente di eseguire 102 test o 17 reazioni di 6 diluizioni.

2 - INTRODUZIONE

L'idatidosi o echinococcosi è un'affezione parassitaria che corrisponde allo sviluppo nell'ospite intermedio, uomo compreso, della larva (idatide) di un cestode del genere *Echinococcus*. Il ciclo di *Echinococcus granulosus* coinvolge il cane come ospite definitivo e il pecora o, più raramente, uomo, come ospite intermedio.

La localizzazione dell'idatide nel fegato è la più frequente (dal 50 al 70%), seguita da localizzazione polmonare (dal 25 al 40%).

L'idatidosi da *Echinococcus granulosus* è caratterizzata dalla lentezza della sua evoluzione e dalla sua ritmo insidioso. Rimane poco sintomatico e la diagnosi biologica lo è essenzialmente immunologico cercando anticorpi.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A *Echinococcus* si basa su emoagglutinazione indiretta.

Eritrociti sensibilizzati sono composti di eritrociti di pecora rivestiti con un antigene *Echinococcus granulosus*.

La presenza degli anticorpi anti-*Echinococcus granulosus* in campioni di siero è rivelata da un'agglutinazione dei eritrociti sensibilizzati: una pellicola rossicia-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 micropiastrea 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 2,2 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.
- Le fiale **CONTROL** contengono sodio azide (con una contrazione 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 contaminati
- 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 micropiastrea

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

- 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 micropiastrea, 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

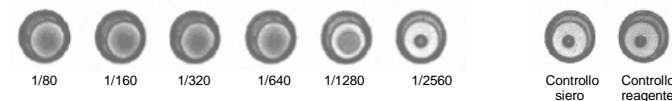
- Agitare con cautela il reagente **R3**.
- Introdurre in un tubo e mescolare:
 - 0,1 mL di siero test;
 - 0,3 mL di reagente **R3**.
- Incubare per 60 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 giri/min per 15 min.
- Raccogliere il fluido supernatante; il siero quindi è diluito 1/4.
- Diluire 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 micropiastrea" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

10 - LETTURA DEI RISULTATI

Reazione negativa: **No emoagglutinazione**
Presenza di sul fondo del pozzetto. un anello più o meno ampia

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

Esempio: siero positivo a 1/1280



11 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Titolo < 1/160: **Reazione non significativo.**
Probabile assenza di echinococcosi.
Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una elettrosinnesi o un immunoelettroforesi.

Titolo = 1/160: **Reazione equivoco.**
Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una elettrosinnesi o un immunoelettroforesi.

Titolo ≥ 1/320: **Reazione significativo a favore di una echinococcosi acuta.**

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 emoagglutinazione 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 emoagglutinazione limite.
- Il controllo del siero deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoagglutinazione 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 emoagglutinazione di questo controllo, il reagente **ELI.H.A Echinococcus** non potrebbe essere usato.
- Alcuni sieri, con un titolo anticorpale molto elevato, possono causare un fenomeno di zona (con rottura della pellicola) alle prime diluizioni, che scompare con diluizioni crescenti.
- La qualità dei reagenti permette l'effettuazione della reazione di sera, con lettura la mattina successiva, purché la micropiastrea 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 Echinococcus è composto dei eritrociti sensibilizzati da un antigene *Echinococcus granulosus* che assicura sensibilità e specificità per la reazione. Uno studio di 221 sieri umani mostrano una sensibilità del 93% (a seconda di quale popolazione cisti) ed una specificità del 94,9%. Studio comparativo con IFI e con test ELISA ha mostrato la complementarità di questi vari test (2).

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. A. CAPRON, L. YARZABAL, A. VERNES, J. FRUIT - Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine - *Path. - Biol.*, 1970, Vol. 18, n° 7-8, 357-368.
2. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L'hémagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de l'hydatidose. Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA - *Lyon Médical*, 1979, 241, 755-759.
3. P. WATTRE, M. CAPRON, A. BEKHTI, A. CAPRON - Diagnostic immunologique de l'Hydatidose - *La nouvelle presse médicale*, 1980, 9, n°5, 305-309.
4. P. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, n°123, 417/55-60.

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

