

# ELI.H.A *Echinococcus*

Serodiagnóstico da idatidose por hemaglutinação indirecta

102 Testes

(Ref. 66604)

8000140-PT-2012-01

Para uso diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.



## 1 - OBJETIVO

ELI.H.A *Echinococcus* permite a determinação quantitativa de anticorpos anti-*Echinococcus granulosus* em amostras de soro por hemaglutinação indirecta.

O kit permite realizar 102 testes ou 17 reações de 6 diluições.

## 2 INTRODUÇÃO

Idatidose ou equinococose é uma condição parasitária que corresponde ao desenvolvimento no hospedeiro intermediário, incluindo o homem, da larva (idílio) de um cestode do género *Echinococcus*. O ciclo *Echinococcus granulosus* envolve o cão como hospedeiro definitivo e as ovelhas ou, mais raramente, o homem, como hospedeiro intermediário.

A localização do idídeo no fígado é a mais frequente (50 a 70%), seguida pela localização pulmonar (25 a 40%).

O *Echinococcus granulosus* é caracterizado pela lentidão da sua evolução e pelo seu ritmo insidioso. Ainda há pouco sintomático e o diagnóstico biológico é essencialmente imunológico à procura de anticorpos.

## 3 - PRINCÍPIO

O ELI.H.A *Echinococcus* baseia-se na hemaglutinação indirecta.

Os eritrócitos sensibilizados são compostos por eritrócitos de ovelha revestidos com um antígeno de *Echinococcus granulosus*.

A presença de anticorpos anti-*Echinococcus granulosus* em amostras de soro é revelada por uma aglutinação de eritrócitos sensibilizados: um filme marrom-avermelhado no poço. Na ausência de anticorpos específicos, esses eritrócitos se depositam e formam um anel no fundo do poço.

Os eritrócitos não sensibilizados, garantem a especificidade da reação e permitem a eliminação de interferências devido a aglutininas naturais anti-heep (heteroanticorpos de Forssman, anticorpos de mononucleose infecciosa...).

A reação é realizada em microplaca U.

O teste é rápido e fácil. Os resultados são obtidos em 2 horas.

## 4 - REAGENTES E MATERIAIS

Descrição	Quantidade
<b>R1:</b> Frasco de 2,2 mL de glóbulos vermelhos sensibilizados	1
<b>R2:</b> Frasco de 1 mL de eritrócitos não sensibilizados	1
<b>BUF:</b> Frasco de 55 mL de solução tampão fosfato pH 7,2	1
<b>R3:</b> Frasco de 2 mL de absorvente	1
<b>CONTROLE +:</b> frasco de 0,2 mL de controle positivo titulado	1
<b>CONTROLE -:</b> frasco de controle negativo de 0,2 mL	1
<b>MICROPLACA:</b> U-Microplacas	2
<b>CONTA-GOTAS:</b> Conta-gotas especial	2

## 5 - ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- Apenas para uso diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional

- Os ensaios destinam-se apenas a utilização única.

- Todos os reagentes, exceto o reagente **BUF**, contêm material de origem animal. Consequentemente, eles devem ser manuseados como componentes perigosos.

- As amostras são potencialmente infecciosas. Eles devem ser manuseados com as precauções usuais, em conformidade com as regras e regulamentos de higiene em vigor no país de uso.

- Os frascos para injetáveis de **CONTROLO** contêm azida de sódio (com uma contração inferior a 0,1% p/p).

- Não utilize reagentes após o prazo de validade.

- Não troque reagentes e controles de lotes diferentes.

- Permitir que reagentes e amostras retornem à temperatura ambiente antes do teste.

- Agite cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.

- Ao derramar os reagentes **R1** e **R2**, certifique-se de que a agulha conta-gotas esteja perfeitamente vertical. Verifique se não há bolhas de ar nas gotas para garantir volumes de entrega constantes.

## 6 - AMOSTRAGEM/PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Use soros frescos ou soros armazenados a -20°C. Não utilize soro hemolisado, turvo ou contaminado.

Evite o congelamento e descongelamento repetidos.

Não descompilque o soro.

## 7 - MÉTODOS DE ARMAZENAMENTO

Os reagentes estão prontos para uso. Armazenar a +2°...+8°C, até o prazo de validade indicado na embalagem. Não congelar.

## 8 - MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Pipeta (s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado (s) à quantidade a medir

- Recipiente de resíduos contaminados

- Centrifugadora

- Tubos de hemólise

## 9 - EXECUÇÃO DO TESTE

Antes de usar, deixe os reagentes e amostras voltarem à temperatura ambiente.

### 9.1 - Preparação da diluição 1/40 do estoque de soro de teste

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 microplaca

- Usando uma micropipeta multicanal, despeje 50 µL de reagente **BUF** em 8 poços da microplaca.

- Usando uma micropipeta, adicione 50 µL de diluição de estoque de soro no primeiro poço.

Misture com o reagente **BUF** e transfira, preferencialmente por meio de um microdiluidor, 50 µL do primeiro poço para o segundo poço, do segundo poço para o terceiro poço e assim por diante para o sexto poço. Descarte 50 µL do sexto poço.

Assim, obtemos diluições de 1/80 a 1/2560.

- Adicionar 50 µL de diluição de reserva de soro no sétimo poço.

Misturar com o reagente **BUF** e descartar 50 µL.

Essa diluição de 1/80 é o controle sérico e é utilizada para a detecção de aglutininas naturais

antivegetativas, que podem ocorrer em algumas ser.

- Agitar cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2**.

• Distribua uma gota de reagente **R1** nos primeiros seis poços.

• Distribua uma gota de reagente **R2** no sétimo poço (controle do soro).

• Distribua uma gota do reagente **R1** no oitavo poço (controle do reagente). Sua função é verificar a validade do reagente **BUF** e do reagente **R1**.

Nota: Prepare apenas um controle de reagente por conjunto de ensaio.

- Com muita cautela, homogeneizar o conteúdo dos poços :

• Manualmente, dando golpes leves nas laterais da microplaca, colocadas planas

• Ou com um vibrador agitador para microplacas (por exemplo, 1300 rpm durante 10 segundos).

• Não use um agitador orbital.

- Em seguida, deixe a placa imóvel, longe das vibrações.

- Leia a reação duas horas depois.

### 9.3 - Absorção de aglutininas naturais anti-heep em caso de aglutinação de controle de soro

- Agitar cuidadosamente o reagente **R3**.

- Colocar num tubo e misturar :

• 0,1 mL de soro de teste ;

• 0,3 mL de reagente **R3**.

- Incubar durante 60 min à temperatura ambiente.

- Centrifugue a 2000 rpm por 15 min.

- Recolher o líquido sobrenadante : o soro é então diluído 1/4.

- Diluir o fluido sobrenadante 1/10 com o reagente **BUF** para obter uma solução-mãe adsorvida (1/40).

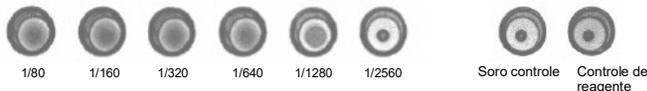
- Seguir o protocolo de "Realização do teste em microplaca" substituindo a diluição estoque pela solução estoque adsorvida.

## 10 - LEITURA DOS RESULTADOS

**Reacção negativa:** Sem hemaglutinação  
Presença de um fundo do cockpit. Um anel mais ou menos largo

**Reação positiva:** Hemaglutinação  
Presença de um filme marrom-avermelhado no poço : às vezes, a presença de um anel periférico fino

Exemplo: Soro positivo em 1/1280



## 11 - INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

**Título < 1/160:** Reação não significativa.  
Provável ausência de equinococose.  
Repita o teste 2 ou 3 semanas depois e combine uma eletrossinereose ou imunoeletroforese.

**Título = 1/160:** Reação enganosa.  
Repita o teste 2 ou 3 semanas depois e combine uma eletrossinereose ou imunoeletroforese.

**Título ≥ 1/320:** Reação significativa a favor da equinococose aguda.

## 12 - CONTROLE INTERNO DA QUALIDADE

Cada kit inclui **CONTROLE -** e **CONTROLE +** titulado, pronto para uso e executado como amostras. Essas verificações validam o teste. O título do **CONTROLE +** deve ser de ± uma diluição em relação ao indicado no rótulo do frasco. A hemaglutinação não deve ser observada com o **CONTROLE -**. Caso contrário, o teste não é válido.

## 13 - CAUSAS DO ERRO E LIMITAÇÕES DO TESTE

- Armazenamento deficiente de soro.
- Armazenamento deficiente de reagentes após a abertura.
- Utilize apenas os conta-gotas fornecidos no kit.
- Não troque conta-gotas entre os reagentes **R1** e **R2**.
- Em caso de reação positiva nos primeiros seis poços, fazer diluições mais elevadas para determinar o título de hemaglutinação limite.
- A verificação do soro deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controle, é necessário repetir o ensaio após a eliminação das aglutininas naturais antipeles por absorção.
- O controle do reagente deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controle, o reagente **ELI.H.A Echinococcus** não pôde ser utilizado.
- Alguns soros, com um título de anticorpos muito alto, podem causar um fenômeno de zona (com encolhimento do filme) nas primeiras diluições, que desaparece com o aumento das diluições.
- A qualidade dos reagentes permite que a reação seja realizada à noite, com leitura na manhã seguinte, desde que a microplaca permaneça imóvel e protegida das vibrações.
- Em qualquer caso, o diagnóstico deve ser avançado usando os resultados deste teste juntamente com os outros achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

## 14 - DESEMPENHO DO KIT

ELI.H.A *Echinococcus* é composto por eritrócitos sensibilizados por um antígeno *Echinococcus granulosus* que garante sensibilidade e especificidade para a reação. Um estudo de 221 ser humano mostrou uma sensibilidade de 93% (dependendo da posição do cisto) e uma especificidade de 94,9%. Estudo comparativo com IFI e com teste ELISA mostrou a completude desses vários testes (2).

## 15 - ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Amostras, reagentes e materiais e produtos contaminados devem ser descartados em recipiente especial para resíduos contaminados, de acordo com as recomendações e regulamentos vigentes para este tipo de produto no país de uso.

Em caso de derramamento acidental do reagente **BUF**, limpe a superfície com toalhas de papel e água. Se o soro ou outro reagente for derramado, limpe a superfície com toalhas de papel, água e alvejante.

## 16 - BIBLIOGRAFIA

1. A. CAPRON, L. YARZABAL, A. VERNES, J. FRUIT - Le diagnostic immunologique de l' 'ecinococose humaine - *Path. - Biol.*, 1970, Vol. 18, no. 7-8, 357-368.
2. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L' 'hemagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de l' 'idatidose. Comparaison avec l' 'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA - *Lyon Medical*, 1979, 241, 755-759.
3. P. WATTRE, M. CAPRON, A. BEKHTI, A. CAPRON - Diagnostic immunologique de l' 'Hydatidose - *La nouvelle presse* (1980, 9, n°5, 305-309).
4. P. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en micologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tomo XIII, n°123, 417/55-60.

As alterações da versão anterior são destacadas em cinza.

ELITech MICROBIO

Parc d' 'actives 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

