

ELI.H.A Distoma

Sérodiagnostic de la distomatose par hémagglutination indirecte

102 tests
(Réf. 66606)

8000150-fr-2012-09



1 - BUT

ELI.H.A Distoma permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Fasciola hepatica* par hémagglutination indirecte. Le coffret permet de réaliser 102 tests ou 17 réactions de 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

Les distomatoses sont des parasitoses dues à des trématodes et selon la localisation des adultes chez l'hôte définitif, on distingue :

- les distomatoses hépato-biliaires
- les distomatoses intestinales
- les distomatoses pulmonaires

Parmi les distomatoses hépato-biliaires, celle provoquée par *Fasciola hepatica* a un cycle évolutif chez l'hôte définitif, dont l'homme, qui comprend une phase de migration larvaire transpéritonéale et transhépatique. Le diagnostic biologique de cette parasitose pendant la phase d'invasion est essentiellement immunologique par la recherche d'anticorps (phase où il n'y a pas d'émission d'œufs dans les selles). Ce diagnostic immunologique présente aussi un grand intérêt pendant le début de la phase d'état, car les œufs sont émis en faible quantité.

3 - PRINCIPE

ELI.H.A Distoma est basé sur le principe de l'hémagglutination indirecte. Les hématies sensibilisées sont constituées d'hématies de mouton recouvertes par un antigène de *Fasciola hepatica*.

La présence d'anticorps anti-*Fasciola hepatica* 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 sédimentent 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 mononucléose infectieuse...).

La réaction s'effectue en microplaque à fond en U.

La manipulation est simple et rapide. Les résultats sont obtenus en 2 heures.

4 - REACTIFS ET MATERIEL

Description	Quantité
R1 : flacon de 2,2 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 flacons **CONTROL** contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%)
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser de réactifs ni de contrôles 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.

Eviter 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

Equilibrer 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 1^{ère} cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule, en rejetant 50 µL de la 6^{ème} cupule. On obtient ainsi les dilutions 1/80 jusqu'au 1/2560.

Distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 7^{ème} 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 **R1** dans les 6 premières cupules.
- Déposer 1 goutte de réactif **R2** dans la 7^{ème} cupule (témoin sérum).
- Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8^{ème} 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 positive : Présence d'hémagglutination.
Présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule ; parfois, présence d'un fin liseré périphérique.

Exemple : Sérum positif au 1/1280



11 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Titre < 1/160 : Réaction non significative.
Absence probable de distomatose.
Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.

Titre = 1/160 : Réaction douteuse.
Renouveler le test 2 à 3 semaines plus tard et associer une électrosynérèse ou une immunoelectrophorèse.

Titre ≥ 1/320 : Réaction significative en faveur d'une distomatose évolutive.

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 Distoma** 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, à condition 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 Distoma est constitué d'hématies sensibilisées par un antigène de *Fasciola hepatica*. Il assure sensibilité et spécificité à la réaction.

Ainsi, les résultats des évaluations du test montrent une sensibilité de 96,1 % et une spécificité de 96,6 %.

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

- P. WATTRE, M. CAPRON, A. CAPRON - Le diagnostic immunologique de la distomatose à *Fasciola hepatica* (à propos de 105 observations) - *Lille Médical*, 3^{ème} Série, 1978, Tome XXIII, N°5, 292-296.
- I.N.R.A. - Travaux effectués dans le cadre de l'I.N.R.A. sur la cinétique des anticorps dans *Fascioloose Bovine* - 1978.
- K. DELLAGI - La Distomatose hépatique : enquête épidémiologique et étude clinique, biologique et thérapeutique à propos de 50 cas - *Université Pierre et Marie CURIE, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière*, 1981.
- B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417/55-60.

ELITech MICROBIO
Parc d'Activités du Plateau
19 Allée d'ATHÈNES
83870 SIGNES
FRANCE
☎ : 04 94 88 55 00
Fax : 04 94 88 55 22



ELI.H.A Distoma

Serodiagnosis of distomatosis by indirect haemagglutination

102 tests
(Ref: 66606)

8000150-en-2012-09



1 - AIM
ELI.H.A Distoma enables the quantitative determination of anti-*Fasciola hepatica* serum antibodies by indirect haemagglutination.

Each kit allows 102 tests to be carried out or 17 reactions of 6 dilutions.

2 - INTRODUCTION

The distomatosis are parasitic diseases caused by trematodes. The location of the adult worms in the host gives rise to the following classifications:

- hepato-biliary distomatosis
- intestinal distomatosis
- pulmonary distomatosis

Of the hepato-biliary distomatosis, infection with *Fasciola hepatica* is characterized by a progressive life-cycle in the human definitive host, which includes a transperitoneal and transhepatic larval migratory phases. Diagnosis of *F. hepatica* is primarily immunological during the invasive phase of infection and relies upon the detection of antibodies (phase where there is no faecal egg transmission). Immunological diagnosis is also of great interest during the early disease state phase, because the eggs are only emitted in small quantities.

3 - PRINCIPLE
ELI.H.A Distoma is based on the indirect haemagglutination principle. The sensitized red blood cells consist of sheep red blood cells covered with a *Fasciola hepatica* antigen. The presence of anti-*Fasciola hepatica* serum antibodies results in agglutination of the sensitized red blood cells resulting in a cloudy red/brown deposit coating the well. In the absence of specific antibodies, the red blood cells form a ring-like deposit at the bottom of the well. The non-sensitized red blood cells ensure the specificity of the reaction making it possible to eliminate any interference from the natural anti-sheep agglutinins (Forsman heteroantibodies, erythrocyte mononuclear antibodies, ...).

4 - REAGENTS AND MATERIAL

Handling is simple and fast, with results within 2 hours. The reaction is carried out in a U-microplate.

Description	Quantity
R1 : Vial of 2 mL of sensitized red blood cells	1
R2 : Vial of 1 mL of non-sensitized red blood cells	1
BUF : Vial of 55 mL of phosphate buffer pH 7.2	1
R3 : Vial of 2 mL of adsorbent	1
CONTROL + : Vial of 0.2 mL of titrated positive control	1
CONTROL - : Vial of 0.2 mL of negative control	1
MICROPLATE : Microplate with a U-bottom	2
DROPPER : Special dropper	2

5 - PRECAUTIONS

The reagents are intended for *in vitro* diagnostic use only and must be handled by authorized personnel.

- Tests are for a single use only.
- All the reagents, except the **BUF** reagent, contain raw materials of animal origin and must be handled with caution.
- Patient samples are potentially infectious. They must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.
- Do not use reagents from different batch numbers.
- Prior to use, allow the serum and the reagents to reach room temperature.
- Carefully shake the **R1** and **R2** reagents before use.
- When dispensing the **R1** and **R2** reagents, make sure that the dropper is perfectly vertical.

6 - SAMPLE COLLECTION AND TREATMENT
Use fresh serum or serum preserved at -20°C, and not showing any sign of haemolysis, cloudiness or contamination.
Avoid repeated freezing and defrosting.
Do not decontaminate the serum.

7 - STABILITY, STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

The reagents are ready-to-use.
All the reagents stored at 2-8°C, in their original packaging, are stable until the expiry date indicated on the box. Do not freeze.

8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Automatic pipette(s) with a pipetting volume adapted to the volume that will be measured;
- Contaminated waste containers;
- Centrifuge;
- Haemolysis tubes.

9 - METHOD

Allow the reagents to reach room temperature before use.

9.1 - Sample preparation

Carry out a 1:40 dilution of the serum to be tested:

- 50 µL of serum;
- 1.95 mL of **BUF** reagent.

9.2 - Realization of the test on a microplate

Using a multichannel micropipette, add 50 µL of **BUF** reagent to 8 wells of the microplate.

- Using micropipette, add 50 µL of diluted serum to the 1st well.
- Mix the serum with the **BUF** reagent and then discard 50 µL.
- In this way, dilutions from 1:80 to 1:2560 are obtained.
- Carefully shake the **R1** and **R2** reagents.
- Add 1 drop of **R1** reagent to the first 6 wells.
- Add 1 drop of **R2** reagent to the 7th well (serum control).
- Add 1 drop of **R1** reagent to the 8th well (reagent control) whose role is to control the validity of the **BUF** and **R1** reagent.

Very carefully, shake the contents of the wells:

- either manually, by tapping laterally the side of the microplate that has been posed flat on the bench;
- or by using a vibrating plate shaker for microtiter plates (for example at 1300 rpm for 10 seconds). Do not use an orbital shaker.

Now leave the plate to rest, away from any sources of vibration.

The plate can be read after 2 hours.

9.3 - Adsorption of the natural anti-sheep agglutinins in the event of agglutination of the serum control

- Carefully shake the **R3** reagent.
- In a tube, add and mix:
- 0.1 mL of serum;
- 0.3 mL of **R3** reagent.
- Incubate at room temperature for 60 minutes.
- Centrifuge at 2000 rpm for 15 minutes.
- Collect the supernatant; the serum is now at a 1:4 dilution.
- Carry out a 1:10 dilution of the supernatant in **BUF** reagent to obtain an adsorbed stock dilution (1:40).
- Follow the steps described in "Realization of the test on a microplate", but replace the stock dilution by the adsorbed stock dilution.

10 - READING

Negative reaction:
Absence of haemagglutination.

Presence of a more or less large ring at the bottom of the well.

Positive reaction:
Presence of haemagglutination.

Presence of a cloudy red/brown deposit coating the well, sometimes there is the presence of a fine peripheral border.

Example: Serum positive at a dilution of 1:1280



11 - INTERPRETATION OF RESULTS

Non significant reaction.

Probable absence of distomatosis.

Renew the test 2 to 3 weeks later and also carry out an electrosyneresis or an immunoelectrophoresis test.

Doubtful reaction.

Renew the test 2 to 3 weeks later and also carry out an electrosyneresis or an immunoelectrophoresis test.

Titre ≥ 1:320:

Significant reaction in favour of progressive distomatosis.

12 - INTERNAL QUALITY CONTROL

The **CONTROL +** and **CONTROL -** reagents must be treated like test serums. The titer of the **CONTROL +** reagent must be the same as the titer printed on the vial label ± one dilution. There must not be any haemagglutination of the **CONTROL -**. If haemagglutination is present then the test is not valid.

13 - CAUSES OF ERROR AND TEST LIMITS

- Poor conservation of the reagents after opening.
- Only use the droppers provided in the kit.
- Do not interchange the droppers between the **R1** and **R2** reagents.
- In the case of a positive reaction in the first 6 wells, carry out a further serial dilution in order to determine the titer limit of haemagglutination.
- The serum control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, it will be necessary to renew the test after having eliminated the natural anti-sheep agglutinins from the serum by adsorption.
- The reagent control must give a negative reaction (ring). In the event of haemagglutination of this control, the ELI.H.A Distoma cannot be used.
- Certain serums, whose antibody concentration is very high, can give rise to a zone phenomenon (with disappearance of the clouding) in the initial dilutions, which which disappears in the subsequent dilutions.
- The quality of the reagents makes it possible to carry out the reaction in the evening and to read the test the following morning, provided that the microplate is not moved in any way and is protected from any sources of vibration
- In all cases, it is necessary that the clinical, epidemiologic and biological data are taken fully into consideration before establishing the final diagnosis.

14 - PERFORMANCE

ELI.H.A Distoma consists of red blood cells sensitized with a *Fasciola hepatica* antigen, that ensures the specificity and sensitivity of the reaction.

Evaluation has demonstrated that the test has a sensitivity of 96.1% and a specificity of 96.6%.

15 - WASTE ELIMINATION

Waste should be disposed of in accordance with the hygiene rules and current regulations for this kind of product in the country of use.

1. P. WATTRE, M. CAPRON, A. CAPRON - Le diagnostic immunologique de la distomatose à *Fasciola hepatica* (à propos de 105 observations) - *Lille Médical*, 3^{ème} Série, 1978, Tome XXIII, N°5, 292-296.
2. I. N. R. A. - Travaux effectués dans le cadre de II. N. R. A. sur la cinétique des anticorps dans Fasciose Bovine - 1978.
3. K. DELLAGI - La Distomatose hépatique : enquête épidémiologique et étude clinique de *Médecine Fille-Salpitrière*, 1981.
4. B. PESSION, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie eten mycologie - *Le Phamacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417/55-60.

