

# ELI.H.A *Distoma*

## Serologischer Distomatose-Nachweis durch indirekte Hämagglutination

102 Tests  
(Ref. 66606)

8000150-de-2012-09



### 1 - VERWENDUNGSZWECK

ELI.H.A *Distoma* ermöglicht die quantitative Bestimmung von anti-*Fasciola hepatica* Antikörpern im Serum durch indirekte Hämagglutination. Mit jedem Kit können 102 Tests oder 17 Reaktionen mit 6 Verdünnungen durchgeführt werden.

### 2 - EINLEITUNG

Bei den Distomatosen handelt es sich um parasitäre Krankheiten, die durch Trematoden verursacht werden. Nach der Lage der erwachsenen Würmer im Wirt werden sie wie folgt eingeteilt:

- hepatobiliäre Distomatose
- intestinale Distomatose
- pulmonale Distomatose

Bei der hepatobiliären Distomatose ist die Infektion mit *Fasciola hepatica* durch einen progressiven Lebenszyklus im Endwirt Mensch gekennzeichnet, der eine transperitoneale und transhepatische Larvenwanderungsphase umfasst. Die Diagnose von *F. hepatica* erfolgt in erster Linie immunologisch während der invasiven Phase der Infektion und stützt sich auf den Nachweis von Antikörpern (Phase, in der keine fäkale Eiübertragung stattfindet). Die immunologische Diagnose ist auch in der frühen Krankheitsphase von großem Interesse, da die Eier nur in geringen Mengen ausgeschieden werden.

### 3 - TESTPRINZIP

ELI.H.A *Distoma* basiert auf dem Prinzip der indirekten Hämagglutination. Die sensibilisierten roten Blutkörperchen bestehen aus roten Blutkörperchen von Schafen, die mit einem *Fasciola hepatica* Antigen beschichtet sind. Das Vorhandensein von anti-*Fasciola hepatica* Serumantikörpern führt zur Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten, was zu einem trüben rot-braunen Belag in der Vertiefung führt. In Abwesenheit spezifischer Antikörper bilden die roten Blutkörperchen eine ringförmige Ablagerung am Boden der Vertiefung.

Die nicht sensibilisierten Erythrozyten gewährleisten die Spezifität der Reaktion, so dass jegliche Störung durch die natürlichen anti-Schaf-Agglutinine (Forssman-Heteroantikörper, infektiöse Mononukleose-Antikörper...) ausgeschlossen werden kann. Die Reaktion wird in einer U-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Handhabung ist einfach und schnell, die Ergebnisse liegen innerhalb von 2 Stunden vor.

### 4 - REAGENZEN UND MATERIALIEN

Beschreibung	Menge
<b>R1:</b> Röhrchen mit 2,2 ml sensibilisierten roten Blutkörperchen	1
<b>R2:</b> Röhrchen mit 1 ml nicht-sensibilisierten roten Blutkörperchen	1
<b>BUF:</b> Fläschchen mit 55 ml Phosphatpuffer-Lösung; pH 7.2	1
<b>R3:</b> Röhrchen mit 2 ml Adsorbent	1
<b>CONTROL +:</b> Röhrchen mit 0,2 ml titrierte Positivkontrolle	1
<b>CONTROL -:</b> Röhrchen mit 0,2 ml Negativkontrolle	1
<b>MICROPLATE:</b> Mikrotiterplatte (u-förmig)	2
<b>DROPPER:</b> Spezial-Dropper	2

### 5 - WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reagenzien sind nur für die *in-vitro* Diagnostik bestimmt und dürfen nur von autorisiertem Personal verwendet werden.
- Die Tests sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt.
- Alle Reagenzien, mit Ausnahme des **BUF**-Reagenzes, enthalten Rohstoffe tierischen Ursprungs und müssen mit Vorsicht gehandhabt werden.
- Die Patientenproben sind potenziell infektiös. Sie müssen unter Beachtung der Hygienevorschriften und der im jeweiligen Land geltenden Bestimmungen für diese Art von Produkten mit Vorsicht gehandhabt werden.
- Die **CONTROL**-Reagenzien enthalten Natriumazid (<0,1%),
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen verwenden.
- Serum und Reagenzien vor Verwendung Raumtemperatur annehmen lassen.
- Reagenzien **R1** und **R2** vor der Verwendung vorsichtig schütteln.
- Beim Dosieren der Reagenzien **R1** und **R2** darauf achten, dass der Tropfer genau senkrecht steht. Darauf achten, dass keine Luftblasen in den Tropfen sind, um ein konstantes Abgabevolumen zu gewährleisten.

### 6 - PROBENENTNAHME UND PROBENHANDHABUNG

Frisches Serum oder bei -20°C konserviertes Serum verwenden, das keine Anzeichen von Hämolyse, Trübung oder Kontamination aufweist. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Keine Wärmevorbehandlung (Zersetzung) des Serums durchführen.

### 7 - STABILITÄT, LAGERUNG UND REAGENZVORBEREITUNG

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien sind, in der Originalverpackung bei 2-8°C gelagert, bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nicht einfrieren.

### 8 - ERFORDERLICHE MATERIALIEN (nicht im Kit enthalten)

- Automatische Pipette(n) mit einem an das zu messende Volumen angepassten Pipettier-volumen;
- Behälter für kontaminierte Abfälle;
- Zentrifuge;
- Hämolyseröhrchen.

### 9 - TESTDURCHFÜHRUNG

Vor Einsatz in den Test müssen alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreicht haben.

#### 9.1 - Probenvorbereitung

Eine 1:40-Stammverdünnung des zu testenden Serums vornehmen:

- 50 µl Serum;
- 1,95 ml **BUF**-Reagenz.

#### 9.2 - Test auf Mikrotiterplatte

- Mit einer Mehrkanalmikropipette in 8 Kavitäten der Mikrotiterplatte 50 µl **BUF** pipettieren.

- Mit einer Mikropipette 50 µl verdünntes Serum in die 1. Vertiefung geben. Das Serum mit dem **BUF**-Reagenz mischen und eine Verdünnungsreihe durchführen, indem 50 µl aus der 1. Vertiefung in die 2., dann 50 µl aus der 2. in die 3. und so weiter bis zur 6. Vertiefung übertragen werden. Danach 50 µl aus der 6. Vertiefung entnehmen und verworfen. Auf diese Weise erhält man in den Vertiefungen 1 bis 6 Verdünnungen von 1:80 bis 1:2560.

- In die 7. Kavität 50 µl der 1:40-Serum-Stammverdünnung pipettieren. Mit dem Puffer (**BUF**) mischen und 50 µl entnehmen und verworfen. Diese 1:80-Verdünnung stellt die Serumkontrolle dar und dient dem Nachweis natürlicher anti-Schaf-Agglutinine, die in manchen Seren vorkommen können.

- **R1** und **R2** vorsichtig schütteln.

- In die ersten 6 Vertiefungen jeweils 1 Tropfen **R1** geben.
- In die 7. Vertiefung 1 Tropfen **R2** geben (Serumkontrolle).
- In die 8. Vertiefung 1 Tropfen **R1** geben (Reagenzkontrolle). Dies dient der Richtigkeitskontrolle von **BUF** und **R1**.

Hinweis: Pro Testserie sollte nur 1 Reagenzkontrolle angesetzt werden.

- Inhalt der Vertiefungen sehr sorgfältig homogenisieren:

- entweder manuell durch seitliches Beklopfen der Mikrotiterplattenränder
- oder mit einem Vibrationsschüttler für Mikrotiterplatten (z.B. bei 1300 U/min für 10s) Keine Schüttler mit kreisförmigen Bewegungen (Orbital-, Kreisschüttler) einsetzen.

- Dann die Platte nicht mehr bewegen und frei von Vibrationen stehen lassen.

- 2 Stunden später das Reaktionsergebnis ablesen.

#### 9.3 - Adsorption natürlicher anti-Schaf-Agglutinine im Falle einer Agglutination der Serumkontrolle

- **R3**-Reagenz vorsichtig schütteln.
- Folgendes in ein Röhrchen geben und mischen:
  - 0,1 ml Serum
  - 0,3 ml **R3**
- 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- Bei 2000 U/min für 15 Minuten zentrifugieren.
- Flüssigen Überstand abnehmen; das Serum ist nun 1:4 verdünnt.
- Den Überstand mit **BUF** 1:10 verdünnen, um die adsorbierte 1:40-Stammverdünnung zu erhalten.
- Statt der Stammverdünnung wird diese adsorbierte Stammverdünnung als Testserum eingesetzt und der Test gemäß Anleitung Punkt 9.2 "Test auf Mikrotiterplatte" weitergeführt.

### 10 - BEOBACHTUNG / ABLESEN DER REAKTION

**Negative Reaktion:** Keine Hämagglutination. Auf dem Boden der Vertiefung ist ein mehr oder weniger breiter Ring zu sehen.

**Positive Reaktion:** Hämagglutination. Anwesenheit eines rötlich-braunen Belags auf dem Boden der Kavität; manchmal zeigt sich auch ein dünner peripherer Ring.

Beispiel einer mit einem 1:1280 positiven Serum erzielten Hämagglutination:



### 11 - INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

**Titer < 1:160:** Nicht-signifikante Reaktion. Wahrscheinlich keine Distomatose. Test nach 2 bis 3 Wochen wiederholen und zusätzlich eine Gegenstrom-elektrophorese oder Immunelektrophorese durchführen.

**Titer = 1:160:** Mehrdeutige Reaktion. Test nach 2 bis 3 Wochen wiederholen und zusätzlich eine Gegenstrom-elektrophorese oder Immunelektrophorese durchführen

**Titer ≥ 1:320:** Signifikante Reaktion einer progressiven Distomatose.

### 12 - INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

**CONTROL +** und **CONTROL -** sind wie Patientenproben zu behandeln. Der Titer des Reagenz **CONTROL +** muss mit dem auf dem Fläschchenetikett aufgedruckten Titer ± eine Verdünnung übereinstimmen. **CONTROL -** darf keine Hämagglutination aufweisen. Liegt eine Hämagglutination vor, so ist der Test ungültig.

### 13 - FEHLERURSACHEN UND GRENZEN DER METHODE

- Schlechte Konservierung des Serums.
- Schlechte Konservierung der Reagenzien nach dem Öffnen.
- Nur die im Kit enthaltenen Dropper verwenden.
- Die Dropper dürfen nicht zwischen den Reagenzien **R1** und **R2** ausgetauscht werden.
- Bei positiver Reaktion in den ersten 6 Vertiefungen ist eine weitere Verdünnungsreihe durchzuführen, um die Titergrenze der Hämagglutination zu bestimmen.
- Die Serumkontrolle muss eine negative Reaktion zeigen (Ring). Im Falle einer Hämagglutination dieser Kontrolle muss der Test wiederholt werden, nachdem die natürlichen Anti-Schaf-Agglutinine durch Adsorption aus dem Serum entfernt wurden.
- Die Reagenzkontrolle muss eine negative Reaktion zeigen (Ring). Im Falle einer Hämagglutination dieser Kontrolle kann der **ELI.H.A Distoma** nicht verwendet werden.
- Seren, deren Antikörperkonzentration sehr hoch ist, können in den ersten Verdünnungen ein Zonenphänomen (mit Verschwinden der Trübung) hervorrufen, das in den nachfolgenden Verdünnungen wieder verschwindet.
- Die Qualität der Reagenzien ermöglicht es, die Reaktion am Abend durchzuführen und den Test am nächsten Morgen abzulesen, vorausgesetzt, die Mikrotiterplatte wird in keiner Weise bewegt und vor Erschütterungen geschützt.
- In allen Fällen müssen die klinischen, epidemiologischen und biologischen Daten vollständig berücksichtigt werden, bevor die endgültige Diagnose gestellt wird.

### 14 - LEISTUNGSDATEN

ELI.H.A *Distoma* besteht aus roten Blutkörperchen, die mit *Fasciola hepatica*-Antigen sensibilisiert sind, das die Spezifität und Sensitivität der indirekten Hämagglutinationsreaktion gewährleistet. Die Ergebnisse der Testauswertungen zeigen, eine Sensitivität von 96,1% und eine Spezifität von 96,6%.

### 15 - ABFALLBESEITIGUNG

Die Abfälle sollten gemäß den Hygienevorschriften und den geltenden Bestimmungen für diese Art von Produkten im Land der Verwendung entsorgt werden. Wenn das **BUF**-Reagenz verschüttet wird, dann den Arbeitsbereich mit saugfähigem Papier reinigen und mit Wasser abspülen. Wenn ein Serum oder ein anderes Reagenz auf dem Arbeitsbereich verschüttet wird, diesen mit Bleichmittel und saugfähigem Papier reinigen.

### 16 - LITERATUR

1. P. WATTRE, M. CAPRON, A. CAPRON - Le diagnostic immunologique de la distomatose à *Fasciola hepatica* (à propos de 105 observations) - *Lille Médical*, 3<sup>ème</sup> Série, 1978, Tome XXIII, N°5, 292-296.
2. I.N.R.A. - Travaux effectués dans le cadre de l'I.N.R.A. sur la cinétique des anticorps dans Fasciologie Bovine - 1978.
3. 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.
4. B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie eten mycologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417/55-60.

### ELITech MICROBIO

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

