


ELI.H.A *Distoma*

Sérodiagnostic de la distomatose par hémagglutination indirecte

102 tests
(Réf. 66606)



8000150-FR-2025-07
Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement.
Test à usage unique.

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 *Faciola 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 oeufs sont émis en faible quantité.

3 – PRINCIPLE
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 réactifs contiennent de l'azide de sodium (concentration < 0,1%). L'azide de sodium contenu dans les réactifs peut réagir avec les métaux lourds des canalisations pour former des composés explosifs. Il est donc recommandé de ne pas jeter les réactifs à l'évier et de suivre les recommandations et règlementation d'élimination des déchets en vigueur.
- 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 1ère cupule. Mélanger avec le réactif **BUF** et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur ("tulipe"), 50 µL de la 1ère cupule dans la 2ème, de la 2ème dans la 3ème, et ainsi de suite jusqu'à la 6ème cupule, en rejetant 50 µL de la 6ème cupule. On obtient ainsi les dilutions 1/80 jusqu'au 1/2560.
- Distribuer 50 µL du sérum dilué dans la 7ème 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 7ème cupule (témoin sérum).
- Déposer 1 goutte de réactif **R1** dans la 8ème 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.



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 immunoélectrophorèse.

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

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

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 l'I.N.R.A. sur la cinétique des anticorps dans Fascioloose 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.

Les modifications par rapport à la version précédente sont surlignées en gris.