

ELI.H.A Distoma

Sierodiagnosi di distomatosi tramite emoaagglutinazione indiretta

102 Tests

(Ref. 66606)

8000150-IT-2012-09

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



1 - SCOPO

ELI.H.A Distoma consente la determinazione di quantitativa degli anticorpi anti-*Fasciola hepatica* in campioni di siero tramite emoaagglutinazione indiretta.

Il kit consente di eseguire 102 test o 17 reazioni di 6 diluizioni.

2 - INTRODUZIONE

Le distomatosi sono parassitose causate da trematodi e dipendenti dalla posizione degli adulti nell'ospite definitivo distinguamo:

- distomatosi epatobiliare
- distomatosi intestinale
- distomatosi polmonari

Tra le distomatosi epatobiliari, quella causata da *Fasciola hepatica* ha un ciclo evolutivo nell'ospite definitivo, compreso l'uomo, che comprende una fase di migrazione larvale transperitoneale e transepatico. La diagnosi biologica di questa parassitosi durante la fase di invasione è essenzialmente immunologica cercando anticorpi (fase in cui non vi è emissione di uova nelle feci). Anche questa diagnosi immunologica è di grande interesse durante il inizio della fase di stato, perché le uova vengono rilasciate in piccole quantità.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A Distoma si basa su emoaagglutinazione indiretta. Eritrociti sensibilizzati sono composti di eritrociti di pecora rivestiti con un antigene di *Fasciola hepatica*.

La presenza degli anticorpi anti- *Fasciola hepatica* in campioni di siero è rivelata da un'agglutinazione dei eritrociti sensibilizzati: una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto. 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 micropiastra 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 contaminate
- 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 micropiastra

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

- Tramite una micropipetta, aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nel primo pozzetto. Mescolare con il reagente **BUF** e trasferire, preferibilmente tramite un microdilutore, 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 micropiastra, 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 micropiastra" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

10 - LETTURA DEI RISULTATI

Reazione negativa:

No emoaagglutinazione

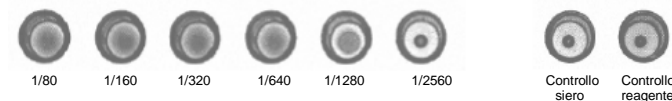
Presenza di sul fondo del pozzetto. un anello più o meno ampia

Reazione positiva:

Emoaagglutinazione

Presenza di una pellicola rossiccia-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 significativa.

Probabile assenza di distomiasi.

Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una electrosyneresis o un immunoelettroforesi.

Titolo = 1/160:

Reazione equivoco.

Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una electrosyneresis o un immunoelettroforesi.

Titolo ≥ 1/320:

Reazione significativo a favore di una distomiasi 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 emoaagglutinazione 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 emoaagglutinazione limite.
- Il controllo del siero deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoaagglutinazione 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 emoaagglutinazione di questo controllo, il reagente **ELI.H.A Distoma** non potrebbe essere usato.
- Alcuni sieri, con un titolo anticorpale molto elevato, possono causare un fenomeno di zona (con retrazione 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 micropiastra 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 Distoma è composto dei eritrociti sensibilizzati da un antigene *Fasciola hepatica* che assicura sensibilità e specificità per la reazione.

Quindi, i risultati delle valutazioni di **ELI.H.A Distoma** mostrano una sensibilità del 96,1 % ed una specificità del 96,6 %.

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. 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 Fasciolose 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 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

