

Sierodiagnosi di distomatosi tramite emoagglutinazione indiretta

(Ref. 66606)

Solo per uso diagnostico *in vitro*, solo per uso professionale.
Test monouso.



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

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

- 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 transesofagea. 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.

ELI.HA 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 rossicia-marrone nel pozzo. 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.

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

- 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.
- I reagenti contengono sodio azide (concentrazione < 0.1%). Il azide di sodio contenuto nei reagenti può reagire con i metalli pesanti presenti nelle tubature formando composti esplosivi. Si raccomanda pertanto di non smaltire i reagenti nel lavandino e di seguire le raccomandazioni e le normative vigenti per lo smaltimento dei rifiuti.
- 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 reagente **R1** e **R2** prima dell'uso.
- Quando si versano i reagente **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.

Utilizzare sieri freschi o sieri conservati a -20°C. Non usare siero emolizzato, torbido o contaminato.

Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti.
Non decompilcare il siero.

I reagenti sono pronti per l'uso. Conservare a +2°...+8°C, fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.

- Pipetta/e automatica/e con volume di pipettaggio adattato alla quantità da misurare
- Contenitore per rifiuti contaminate
- Centrifuga
- Tubi per emolisi

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti e i campioni tornino a temperatura ambiente.

Diluire il siero da testare a 1/40:

- 50 µL di siero;
- 1,95 mL di reagente **BUF**.

- Tramite una micropipetta multicanale, versare 50 μ L di reagente **BUF** in 8 pozzetti della micropiastre.

- Tramite una micropipetta, aggiungere 50 μ L di diluizione stock di siero nel primo pozzetto.
Miscelare con il reagente **BUF** e trasferire, preferibilmente tramite un microlitratore, 50 μ L dal primo pozzetto nel secondo pozzetto, dal secondo pozzetto al terzo, e così via fino al sesto pozzetto. Scartare 50 μ L dal sesto pozzetto.
Otteniamo così le diluizioni da 1/80 fino a 1/2560.
- Aggiungere 50 μ L di diluizione stock di siero nell'ottavo pozzetto.
Miscelare con il reagente **BUF** e scartare 50 μ L.
Questa diluizione 1/80 costituisce il controllo del siero e serve per il rilevamento di agglutinine antipeccora 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 micropietra, 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.

- 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.
- Raccolgere 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 micropiastre" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

Reazione negativa: **No emoagglutinazione**
Presenza di sul fondo del pozzetto. un anello piu o meno ampia

Reazione positiva: **Emoagglutinazione**
Presenza di una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto : talvolta, la
presenza di un anello periferico sottile

Esempio: siero positivo a 1/1280



Titolo < 1/160: **Reazione non significativo.**
Probabile assenza di distomiasi.
Ripetere la prova di 2 o 3 settimane più tardi e associare una
electrosvernesis o un immunoelettroforesi.

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

Titolo $\geq 1/320$: Reazione significativo a favore di una distomiasi acuta.

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 \pm una diluizione rispetto a quella indicata sull'etichetta della fiala. Non deve essere riscontrata emoagglutinazione con il **CONTROL -**. Altrimenti il test non è valido.

- 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 micropiasta 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.

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 %.

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.

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^o 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. PESSION, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique - En parasitologie et en mycologie - Le Pharmacien Biologiste, Tome XIII, N^o 123, 417/55-60.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

ELITech MICROBIC

Parc d'activités du Plateau

Allée d'Athènes

82870 SIGNES

83870 SIGNES
FRANCE

Tel: +33 (0) 4 04 88 55 00

<http://www.clitecgroup.com>

