

ELI.H.A *Distoma*

Diagnóstico de distomatose por hemaglutinação indireta

102 testes

(Ref.66606)

8000150-PT-2025-07
Apenas para diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.
Os testes são apenas para uso único.

1 - OBJETIVO
O **ELI.H.A Distoma** permite a determinação quantitativa de anticorpos séricos anti-Fasciola hepatica por hemaglutinação indireta.
Cada kit permite a realização de 102 testes ou 17 reações de 6 diluições.

2 - INTRODUÇÃO
As distomatoses são doenças parasitárias causadas por trematódeos. A localização dos vermes adultos no hospedeiro dá origem às seguintes classificações:

- Hepatobiliar
- Distomatose intestinal
- Hemoptise endêmica

Da distomatose hepatobiliar, a infecção por Fasciola hepatica é caracterizada por um ciclo de vida progressivo no hospedeiro definitivo humano, que inclui uma fase migratória larval transperitoneal e trans-hepática. O diagnóstico de F. hepatica é principalmente imunológico, durante a fase invasiva da infecção e depende da detecção de anticorpos (fase em que não há transmissão de ovos fecais). O diagnóstico imunológico também é de grande interesse durante a fase inicial de doença, porque os ovos são emitidos apenas em pequenas quantidades.

3 - PRINCÍPIO
ELI.H.A Distoma baseia-se no princípio da hemaglutinação indireta. Os glóbulos vermelhos sensibilizados consistem em glóbulos vermelhos de ovelha cobertos com um antígeno de *Fasciola hepatica*.
A presença de anticorpos séricos *anti-Fasciola hepatica* resulta na aglutinação dos glóbulos vermelhos sensibilizados, resultando num depósito vermelho/castanho turvo que reveste o poço. Na ausência de anticorpos específicos, os glóbulos vermelhos formam um depósito semelhante a um anel no fundo do poço.
Os glóbulos vermelhos não sensibilizados garantem a especificidade da reação, possibilitando a eliminação de qualquer interferência das aglutininas naturais anti-ovelha (heteroanticorpos Forssman, anticorpos contra mononucleose infecciosa...).
A reação é realizada numa microplaca em forma de U.
O manuseamento é simples e rápido, com resultados em até 2 horas.

4 – REAGENTES E MATERIAL

Descrição	Quantidade
R1: Frasco de 2,2 mL de hemácias sensibilizadas	1
R2: Frasco de 1 mL de glóbulos vermelhos não sensibilizados	1
BUF: Frasco de 55 mL de tampão fosfato pH 7,2	1
R3: Frasco de 2 mL de adsorvente	1
CONTROL +: Frasco de 0,2 mL de controlo positivo titulado	1
CONTROL -: Frasco de 0,2 mL de controlo negativo	1
MICROPLATE: Microplaca com fundo em U	2
DROPPER: Conta-gotas especial	2

5 – PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas ao uso de diagnóstico *in vitro* e devem ser manuseados por pessoal autorizado.
- Os testes são apenas para uma única utilização.
- Todos os reagentes, exceto o reagente **BUF**, contêm matérias-primas de origem animal e devem ser manuseados com cautela.
- As amostras de pacientes são potencialmente infecciosas. Devem ser manuseadas com cautela, observando as regras de higiene e as normas vigentes para este tipo de produto no país de uso.
- Os reagentes contêm azida de sódio (concentração < 0.1%). A azida de sódio contida nos reagentes pode reagir com os metais pesados nos canos e formar compostos explosivos. Assim, recomenda-se não deitar os reagentes para o lavatório e seguir as recomendações e normas vigentes para a deposição de resíduos.
- Não utilizar após término da data de validade.
- Não use reagentes de números de lote diferentes.
- Antes de usar, deixe o soro e os reagentes atingirem a temperatura ambiente.
- Agite cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.
- Ao dispensar os reagentes **R1** e **R2**, certifique-se de que o conta-gotas esteja perfeitamente na vertical.
- Verifique a ausência de bolhas de ar nas gotas para garantir volumes de entrega constantes.

6 – COLHEITA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS
Use soro fresco ou soro preservado a -20°C e não mostre nenhum sinal de hemólise, nebulosidade ou contaminação.
Evite congelamento e descongelamento repetidos. Não decomponha o soro.

7 – ESTABILIDADE, ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE REAGENTES
Os reagentes estão prontos para uso.
Todos os reagentes armazenados a 2-8°C, na sua embalagem original, são estáveis até a data de validade indicada na caixa. Não congelar.

8 – MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Pipeta(s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado ao volume que será medido;
- Reservatório para lixo contaminado;
- Centrífuga ;
- Tubos de hemólise.

9 - MÉTODO
Deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes de usar.

9.1 – Preparação de amostras
Realize uma diluição de 1:40 do soro a ser testado:

- 50 µL de soro;
- 1,95 mL de reagente **BUF**

9.2 – Realização do teste em microplaca

- Usando uma micropipeta multicanal, adicione 50 µL de reagente **BUF** a 8 poços da microplaca.
- Usando uma micropipeta, adicione 50 µL de soro diluído ao primeiro poço.
Misture o soro com o reagente **BUF** e faça uma diluição seriada, preferencialmente em microdiluidor, transferindo 50 µL do primeiro poço para o segundo, depois 50 µL do segundo para o terceiro, e assim sucessivamente até atingir o sexto poço. 50 µL do sexto poço são então descartados.
Desta forma, obtêm-se diluições de 1:80 a 1:2560
- Adicione 50 µL de soro diluído ao sétimo poço
Misture o soro com o reagente **BUF** e depois descarte 50 µL.
Esta diluição (1:80) é o controlo sérico, cujo papel é detetar as aglutininas naturais anti-ovelha que poderiam estar presentes em certas amostras de soro.

- Agite cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2**.
 - Adicionar 1 gota de reagente **R1** aos primeiros 6 poços.
 - Adicione 1 gota de reagente **R2** ao sétimo poço (controlo de soro).
 - Adicionar 1 gota de reagente **R1** no oitavo poço (controlo de reagente) cuja função é controlar a validade dos reagentes **BUF** e **R1**.

Nota: Realize apenas um controlo de reagente para cada série de testes.

- Com muito cuidado, agite o conteúdo dos poços:
 - manualmente, batendo lateralmente no lado da microplaca que foi colocada plana na bancada;
 - ou, usando um agitador de placas vibratórias para placas de microtitulação (por exemplo, a 1300 rpm por 10 segundos). Não use um agitador orbital.
- Agora deixe a placa em repouso, longe de qualquer fonte de vibração.
- A placa pode ser lida após 2 horas.

9.3 – Adsorção das aglutininas naturais anti-ovelha em caso de aglutinação do soro controlo

- Agite cuidadosamente o reagente **R3**.
- Num tubo, adicione e misture:
 - 0,1 mL de soro;
 - 0,3 mL de reagente **R3**.
- Incubado à temperatura ambiente por 60 minutos.
- Centrifugar a 2000 g durante 15 minutos.
- Recolha o sobrenadante; o soro está agora na diluição de 1:4.
- Realizar uma diluição de 1:10 do sobrenadante em reagente **BUF** para obter uma diluição de estoque adsorvido (1:40).
- Siga as etapas descritas em "Realização do teste em microplaca", mas substitua a diluição do estoque pela diluição do estoque adsorvido.

10 - LEITURA
Reação negativa: Ausência de hemaglutinação.
Presença de um anel mais ou menos grande no fundo do poço.

Reação positiva: Presença de hemaglutinação.
Presença de um depósito vermelho/castanho turvo revestindo o poço, às vezes há a presença de uma borda periférica fina.

Exemplo: Soro positivo a uma diluição de 1:1280



11 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
Título < 1:160: Reação não significativa.
Provável ausência de distomatose.
Repita o teste 2 a 3 semanas depois e também realize uma eletrossinérese ou um teste de imunoeletroforese.

Título = 1:160: Reação duvidosa.
Repita o teste 2 a 3 semanas depois e também realize uma eletrossinérese ou um teste de imunoeletroforese.

Título ≥ 1:320: Reação significativa a favor da distomatose progressiva.

12 – CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE

Os reagentes **DE CONTROLO +** e **CONTROLO –** devem ser tratados como soros de teste. O título do **CONTROLO +** deve ser o mesmo que o título impresso no rótulo do frasco ± uma diluição. Não deve haver nenhuma hemaglutinação do **CONTROLE -**. Se a hemaglutinação estiver presente, o teste não é válido.

13 – CAUSAS DO ERRO E LIMITES DE TESTE

- Má conservação do soro.
- Má conservação dos reagentes após a abertura.
- Use apenas os conta-gotas fornecidos no kit.
- Não troque os conta-gotas entre os reagentes **R1** e **R2**.
- No caso de uma reação positiva nos primeiros 6 poços, realizar uma diluição em série adicional a fim de determinar o limite de título de hemaglutinação.
- O controlo do soro deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, será necessário renovar o teste após ter eliminado as aglutininas naturais anti-ovelha do soro por adsorção.
- O controlo do reagente deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, o **ELI.H.A Distoma** não pode ser usado.
- Certos soros cuja concentração de anticorpos é muito alta, podem dar origem a um fenómeno de zona (com desaparecimento da turvação) nas diluições iniciais, que desaparece nas diluições subsequentes.
- A qualidade dos reagentes permite realizar a reação à noite e ler o teste na manhã seguinte, desde que a microplaca não seja movida de forma alguma e esteja protegida de qualquer fonte de vibração.
- Em todos os casos, é necessário que os dados clínicos, epidemiológicos e biológicos sejam levados plenamente em consideração antes de estabelecer o diagnóstico final.

14 - DESEMPENHO

ELI.H.A Distoma consiste em glóbulos vermelhos sensibilizados com um antígeno de *Fasciola hepatica*, que garante a especificidade e sensibilidade da reação.
A avaliação demonstrou que o teste tem sensibilidade de 96,1% e especificidade de 96,6%.

15 – ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos devem ser eliminados de acordo com as regras de higiene e regulamentos vigentes para este tipo de produto no país de uso.
Se o reagente **BUF** for derramado, limpe a área de trabalho com papel absorvente e enxague com água.
Se um soro de outro reagente for derramado na área de trabalho, limpe com lixívia e papel absorvente.

16 - BIBLIOGRAFIA

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, Tomo 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 Fasciiose 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*, Tomo XIII, N° 123, 417/55-60.

As alterações em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.