ELIstain Paratest

Colorazione e concentrazione di elementi parassiti nelle feci

100 test
(Ref. 66702)

8000320-IT-2025-09_V3

Solo per uso diagnostico in vitro, solo per uso professionale

1 - OBBIETTIVO

ELIstain Paratest consente:

- esame diretto di elementi parassitari nelle feci utilizzando il reagente **R1** (soluzione Para-Color)
- concentrazione di elementi parassitari secondo Bailenger con colorazione mediante reagente **R1**.

Ogni kit consente di eseguire 100 test.

2 - INTRODUZIONE

Molti parassiti (protozoi - elminti) possono causare manifestazioni intestinali o epatiche. La presenza di questi parassiti nell'intestino o nei dotti biliari è confermata dall'esame macroscopico e dall'esame microscopico delle feci. Le manifestazioni cliniche, l'interrogatorio del paziente con particolare attezione alla permanenza in una zona endemica, i risultati di esami biologici come l'ipereosinofilia ematica guidano la diagnosi parassitologica e le tecniche da implementare (1,2).

3 - PRINCIPIO

Esame diretto dopo colorazione mediante reagente R1 (soluzione Para-Color)

Il Para-Color è un metodo di colorazione differenziale degli elementi parassitari che utilizza una miscela di agenti coloranti tra cui il Lugol. Il suo utilizzo facilita il rilevamento di elementi parassitari che appaiono con una colorazione giallo, giallo-arancio o giallo-brunastro su fondo blu più o meno scuro (1,3).

Concentrazione di elementi parassitari secondo il metodo di Bailenger con colorazione mediante reagente R1 (soluzione Para-Color)

Metodo di concentrazione bifase che utilizza l'etere come solvente organico e il reagente **R2** (una soluzione tampone aceto-acetato a pH5) come fase acquosa. L'esame del sedimento viene eseguito dopo la colorazione mediante reagente **R1**, consentendo una più facile rilevazione di elementi parassitari che appaiono di colore giallo, giallo-arancio o giallo-brunastro su fondo blu più o meno scuro (1,3).

4 - REAGENTE

Descrizione	Quantità
R1: fiala da 4,5 mL di soluzione Para-Color.	**1**
R2: fiala da 750 mL di soluzione tampone aceto-acetato a pH5.	**3**
PROVETTA - 30 ml: provette coniche da 30 ml.	**100**
PROVETTA - 10 mL: provette coniche da 10 mL.	**100**
SPATOLA: spatole.	**100**

5 – PRECAUZIONI D'IMPIEGO

- Il reagente è destinato esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e deve essere maneggiato da persone autorizzate e addestrate.
- I test sono solo monouso.
- I campioni dei pazienti sono potenzialmente infettivi. Devono essere manipolati con le consuete precauzioni nel rispetto delle norme igieniche e i regolamenti vigenti per questo tipo di prodotto nel paese di utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.

PARA-COLOR GHS02 – GHS08 – GHS07

H225: Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H315: Provoca irritazione cutanea.
H319: Provoca grave irritazione oculare.

H373: Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.

P210: Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre sorgenti di accensione. Non fumare.
P235: Conservare in un luogo fresco.
P260: Non respirare i vapori.
P403: Immagazzinare in un luogo ben ventilato.

6 – RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI CAMPIONI

Tutte le feci devono essere raccolte senza urina (che uccide i protozoi) e in un recipiente pulito, asciutto e trasparente, ma non necessariamente sterile.
A causa della fragilità di alcune fasi parassitarie, come le forme vegetative protozoarie, si consiglia di trattare le feci il prima possibile dopo il prelievo, entro 6 ore se il campione viene conservato a temperatura ambiente o entro 2-3 giorni se conservato a 2-8 ° C, nel loro recipiente originale o in sospensione in tampone aceto-acetato.

7 – CONSERVAZIONE E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti sono pronti per l'uso. I reagenti conservati a 18-25°C, protetti dai raggi solari, sono stabili fino alla data di scadenza indicata sul kit. - Devono essere ben congelati.

8 – MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

- Pipetta/e automatica/e con un volume di pipettaggio adattato alla quantità da misurare
- Tubi per emolisi
- Etere o acetato di etile
- Pipette Pasteur
- Vetrini + coprioggetti per microscopia
- Contenitore per rifiuti contaminati
- Acqua fisiologica
- Vortex
- Centrifuga
- Microscopio

9 – MODALITÀ OPERATIVA

Esame diretto dopo colorazione mediante reagente R1 (soluzione Para-Color)

a. Omogeneizzare le feci.
b. Prendere un volume di feci equivalente alle dimensioni di un chicco di caffè (300 mg +/- 50 mg indipendentemente dalla sua consistenza) e posizionarlo in un tubo per emolisi contenente 1 mL di diluente (acqua fisiologica, acqua distillata o reagente **R2**).
c. Triturare e agitare fino ad ottenere una sospensione omogenea (utilizzando agitatore tipo Vortex)
d. Utilizzando una micropipetta, posizionare 10 µL di reagente **R1** su un vetrino.
e. Utilizzando la pipetta Pasteur, aggiungere 1 goccia (o 25 µL con una micropipetta) della sospensione di feci al vetrino.
f. Mescolare bene.
g. Coprire con un vetrino coprioggetto e osservare al microscopio con una luce bianca (filtro blu).

Nota: la preparazione deve essere letta estemporaneamente per evitare la lisi di alcuni elementi parassitari.

Concentrazione di elementi parassitari secondo il metodo di Bailenger con colorazione mediante reagente R1 (soluzione Para-Color)

a. Versare 20 mL di reagente **R2** in una provetta conica da 30 mL.
b. Omogeneizzare le feci.
c. Estrarre l'equivalente di 3-4 g, o 3-4 mL se le feci sono fluide e inserirlo nel reagente **R2**.
d. Triturare le feci utilizzando una spatola e agitare energicamente il composto fino ad ottenere una sospensione omogenea (utilizzando un Vortex).
e. Lasciare riposare la miscela per 2-3 minuti per la sedimentazione delle particelle più grossolane.
f. Versare 5 mL del surnatante in una provetta conica da 10 mL.
g. Aggiungere da 2,5 a 3 mL di etere.
h. Tappare il tubo e agitare energicamente per ottenere un'emulsione (agitazione manuale o con agitatore tipo Vortex).
i. Estrarre il tappo dalla provetta e centrifugare la miscela a 150-200 g per 5 minuti per "rompere" l'emulsione.
j. In caso di gelificazione della fase superiore (dovuta a residui lipofili), allentare l'emulsione dalle pareti del tubo utilizzando la pipetta Pasteur.
k. Smaltire il surnatante capovolgendo la provetta.
l. Mettere il sedimento in sospensione utilizzando 1 o 2 gocce di soluzione fisiologica (non lasciare asciugare il sedimento).
m. Utilizzando la micropipetta, posizionare 10 µL di reagente **R1** su un vetrino.
n. Utilizzando la pipetta Pasteur, aggiungere 1 goccia (o 25 µL con una micropipetta) della sospensione al vetrino.
o. Mescolare bene.
p. Coprire con un vetrino coprioggetto e osservare al microscopio con una luce bianca (filtro blu).

N.B.: POSSIBILITÀ DI UTILIZZARE ACETATO DI ETILE COME SOLVENTE ORGANICO AL POSTO DELL'ETERE

L'etere (dietil etere - C_2H_5-O-C_2H_5) è il solvente di riferimento per il metodo di concentrazione di **Bailenger**. Può essere sostituito da acetato di etile in volumi uguali. Va notato, tuttavia, che la solubilizzazione di alcuni frammenti fecali è più difficile con acetato di etile che con dietil etere. **Pertanto, con alcune feci trattate con acetato di etile, lo strato interfase può essere più spesso e il sedimento più voluminoso può presentare numerosi elementi non parassitari che possono ostacolare l'osservazione microscopica.** In questa situazione il sedimento può essere miscelato con una maggiore quantità di diluente, ad esempio con 4 gocce di acqua fisiologica anziché 2. L'esame microscopico deve essere eseguito su più di un vetrino.

10 - INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Gli elementi parassitari appaiono di colore giallo, giallo-arancio o giallo-brunastro su un fondo blu più o meno scuro.

11 – CAUSE DEGLI ERRORI E LIMITIAZIONI DEL TEST

Alcuni elementi possono portare a confusione nella diagnosi coprologica parassitaria. Questi aspetti fuorvianti possono essere la causa di test falsi positivi. Il riconoscimento di numerosi residui digestivi è fondamentale per evitare qualsiasi confusione con elementi parassitari (es. grani di polline, spore fungine, alcuni peli di frutta, parassiti in transito a seguito dell'ingestione di fegato animale contaminato, ecc.) (4)

Alcuni trattamenti non riassorbibili possono interferire con la raccolta e l'identificazione dei parassiti fecali (olio di ricino, olio minerale, bismuto, antibiotici, antimalarici, ecc.)

La ricerca dei parassiti deve essere effettuata da personale addestrato e qualificato in coprologia parassitaria.

Un singolo esame nella ricerca degli elementi parassitari che risulta negativo, non ha alcun valore. L'esame deve essere ripetuto, tenendo conto di eventuali cambiamenti delle fasi parassitarie di alcuni parassiti. In caso di feci negative, è necessario esaminare 2 campioni aggiuntivi con un intervallo di raccolta di 4-5 giorni.

In ogni caso prima della definizione della diagnosi finale, l'interpretazione del test deve essere effettuata nel contesto di tutti i dati clinici, epidemiologici e biologici, nonché di altri risultati del test.

12 – CONTROLLO QUALITA

12.1 - ESAME DIRETTO

Il controllo qualità può essere effettuato dai controlli venduti dalle società KaliDiv ed Eurobio SCIENTIFIC:
- Sospensione fecale con cisti di *Giardia duodenale* (rif CQI KD-Col/PM/Susp-G.dK a KaliDiv): Subsferica (7-10 µm x 8-12 µm), contiene due o quattro nuclei a seconda dello stadio di maturità, nonché residui di flagelli e corpi mediani. Colorazione da giallo ad arancio-giallo su fondo blu.
- Sospensione fecale con forme vegetative di *Entamoeba histolytica* (rif CQI KD/Col/PM/Susp-Eh Fv da KaliDiv): Dimensione da 15 a 40 µm con ectoplasma leggermente colorato ed endoplasma granulare. Il nucleo è grande, 6-8 µm. Presenta una cromatina periferica fine regolare e "perlata" con un piccolo cariosoma centrale o subcentrale. Colorazione da giallo ad arancio-giallo su fondo blu.
- Sospensione fecale con uova di *Trichuris trichiura* (rif 1809-CQI di Eurobio SCIENTIFIC): uova a forma di limone con coperchio trasparente su entrambe le estremità. Colorazione da giallo ad arancio-giallo su fondo blu.

12.2 – METODO DELLA CONCENTRAZIONE

Il controllo qualità può essere effettuato dal CQI KD-TraceColor/Part control venduto dalla società KaliDiv. Il controllo è costituito da particelle sintetiche colorate le cui dimensioni (25 – 100 µm) e la cui natura (idrofila) imitano quelle di alcuni elementi parassitari.

Il fattore di concentrazione ottenuto durante la prova deve essere maggiore o uguale a 10.

13 – PRESTAZIONI

Uno studio comparativo per la ricerca di parassiti è stato eseguito su 83 feci utilizzando tecniche convenzionali (esame diretto senza colorazione – Bailenger senza colorazione) e quelle del kit ELIstain Paratest. Per l'esame diretto e l'esame dopo la concentrazione, qualitativamente, sono stati ottenuti risultati identici con le diverse tecniche in termini di identificazione dei parassiti e della fase parassitaria. È stato notato che l'uso del reagente **R1** (soluzione Para-Color) consente una lettura più facile.
Quantitativamente, per un gran numero di feci, le diverse tecniche danno risultati identici o simili per quanto riguarda il numero di cisti o uova. Per un piccolo numero di feci, sono state osservate differenze ma sono state considerate non significativi perché i risultati sono inferiori al 30% tra le tecniche utilizzate.
Tutti i risultati hanno concluso che le tecniche che utilizzano reagenti ELIstain Paratest hanno consentito un rilevamento almeno uguale a quello delle tecniche standard.

Le prestazioni del metodo ELIstain Paratest sono state valutate confrontandole con i metodi di concentrazione tradizionali (MIF, Bailenger e Ritchie modificato) (5). Le prestazioni di rilevamento delle malattie parassitarie intestinali, la sensibilità, la specificità, i valori predittivi positivi e negativi di ciascun metodo sono stati calcolati ed espressi come percentuali con intervalli di confidenza del 95%. Nota: in assenza di un metodo di riferimento standardizzato, i risultati ottenuti dopo la combinazione di diverse tecniche (all'esame diretto e all'esame dopo la concentrazione) sono stati considerati come riferimento. I risultati ottenuti utilizzando il metodo di concentrazione degli elementi parassitari ELIstain Paratest sono descritti di seguito:

Specie	Sensibilità	Specificità	VVP	VPN
Endolimax nana	88.8 % IC at 95 % [82.5 - 95%]	89.5 % IC at 95 % [75.7 - 100%]	97.7 % IC at 95 % [91.8 – 99.5%]	60.7 % IC at 95 % [50.4 – 70.1%]
Giardia intestinalis	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	97.20 % IC at 95 % [91.9 - 100%]	98.7 % IC at 95 % [93.2 – 99.8%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]
Blastocystis hominis	82,9 % IC at 95 % [75.6 - 100%]	75 % IC at 95% [50.5 – 99.5%]	96.7 % IC at 95% [90.4 – 99.1%]	33.3 % IC at 95 % [24.3 – 43.5%]
Ascaris lumbricoides	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]
Trichuris trichiura	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]	100 % IC at 95 % [100 - 100%]

VPP : Valore predittivo positivo
VPN : Valore predittivo negativo

Non sono state osservate differenze significative nella quantità di detriti tra le tecniche. Tuttavia, la densità di questi detriti nel sedimento quando si utilizzano le tecniche tradizionali Ritchie e MIF ha impedito una lettura completa rispetto alle tecniche del kit ELIstain Paratest. In termini di morfologia, è stato osservato che l'11,6% dei parassiti è stato individuato con il metodo di concentrazione di parassiti ELIstain Paratest rispetto al 7, 13,7 e 11,9%, rispettivamente, con il metodo Bailenger convenzionale, MIF convenzionale e Ritchie modificato.

13.1 – Ripetibilità (esame diretto)

Sui Controlli Interni di Qualità delle uova di *Trichuris trichiura*, forma vegetativa *di Entamoeba histolytica* e cisti di *Giardia duodenalis*, il reagente Para-Color ha una ripetibilità del 100% in termini di rilevamento di parassiti su 10 test di colorazione eseguiti.

13.2 – Ripetibilità (metodo della concentrazione)

Il test della ripetibilità del dispositivo ELIstain Paratest è stato eseguito utilizzando un controllo di qualità interno contenente una concentrazione nota della soluzione-tipo. Il dispositivo ha una ripetibilità del 100% su 10 test di concentrazione, con coefficienti di concentrazione superiori a 10.

13.3 – Riproducibilità (esame diretto)

Sui controlli interni di qualità delle uova di *Trichuris trichiura*, *della forma vegetativa di Entamoeba histolytica* e delle cisti di *Giardia duodenalis*, il reagente Para-Color ha una riproducibilità del 100% in termini di rilevamento dei parassiti su 10 test di colorazione eseguiti.

13.4 – Riproducibilità (metodo della concentrazione)

Il test di riproducibilità del dispositivo ELIstain Paratest è stato eseguito utilizzando un controllo di qualità interno contenente una concentrazione nota di tracciante. Il dispositivo ha una riproducibilità del 100% su 20 test di concentrazione, con coefficienti di concentrazione superiori a 10.

14 – ELIMINAZIONE DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti nel rispetto delle norme e dei regolamenti igienici vigenti per questa tipologia di prodotto nel paese di utilizzo.

In caso di fuoriuscita accidentale di reagente, pulire il piano di lavoro con carta assorbente e risciacquare con acqua. Se viene versato un campione, pulire con candeggina e carta assorbente.

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Société Française de Microbiologie Toxoplasmose. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2022 Chapitre 24 : Infections parasitaires du système digestif.
2. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. Clin Microbiol Rev. 2017 ;31(1) : e00025-17. doi :10.1128/CMR.00025-17
3. ANOFEL. Parasitologie et Mycologie Médicales : Guide Des Analyses et Pratiques Diagnostiques. 2e ed. Elsevier ; 2022. Chapitre 1. Parasitologie : techniques élémentaires.
4. Claude Guiguen, Brice Autier, Jean-Pierre Gangneux, Dominique Chabasse. Coprologie parasitaire : conduite de l'examen et pièges diagnostiques. Revue Francophone des Laboratoires, 2021, 2021 (529), pp.32-42. ff10.1016/S1773-035X(21)00036-8ff. ffhal-03520708f
5. Sow D, Dieng Y, Haouchine D, et al. Comparison of Para-Selles Bailenger/Kop-Color Fumouze, Para-Selles-Iodésine/Kop-Color II Fumouze diagnostic kits with conventional microscopic methods in identifying intestinal parasitic diseases in Senegal. J Parasit Dis. 2017 ;41(3) :814-822. doi :10.1007/s12639-017-0894-6

Ogni incidente grave correlato al dispositivo deve essere notificato al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui è stabilito l'utilizzatore.

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
http://www.elitechgroup.com