

ELI.H.A *Schistosoma*

Serodijagnoza bilharzije
indirektnom hemaglutinacijom

120 testova
(Kat. br. 66600)

8000120-RS-2018-10



1 - NAMENA

ELI.H.A *Schistosoma* omogućava kvantitativno određivanje, indirektnom hemaglutinacijom, serumskih antitela pacijenata sa bilharzijom koji izaziva *Schistosoma mansoni* (intestinalna forma) i *Schistosoma haematobium* (urinarna forma).

Svaki kit omogućava da se uradi 120 testova ili 20 reakcija od 6 razblaženja.

2 - UVOD

Bilharzije, ili šistosomijaze, predstavljaju grupu parazitskih bolesti koje izazivaju nesegmentisani pljosnati crvi reda *Schistosoma*.

U prisustvu adultnih crva, imunitet se stiče progresivno. Ipak, patogeni element bolesti predstavljaju jaja šistosome. Bolest napreduje u tri sukcesivne faze: kontaminacija – invazija – stanje bolesti.

Dijagnoza bilharzije se može uspostaviti identifikacijom jaja, ali se ona ne mogu detektovati pre faze "stanja bolesti". Stoga, imunološka dijagnostika parazira je od presudnog značaja u inicijalnoj fazi bolesti.

3 - PRINCIP

ELI.H.A *Schistosoma* se zasniva na principu indirektno hemaglutinacije. Senzibilisana crvena krvna zrnca sastoje se od crvenih krvnih zrnaca ovce prekrivenih antigenom *Schistosoma mansoni*.

Prisustvo specifičnih antitela seruma dovodi do aglutinacije senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca čiji je rezultat mutan crveno-smeđ talog koji prekriva polje. Kada specifična antitela nisu prisutna, crvena krvna zrnca stvaraju prstenasti talog na dnu polja.

Nesenzibilisana crvena krvna zrnca obezbeđuju specifičnost reakcije što omogućava eliminaciju svakog uticaja prirodnih anti-aglutinina ovce (Forsmanova heteroantitela, antitela infektivne mononukleoze, itd.).

Reakcija se vrši na U-mikropločici.

Rukovanje je jednostavno i brzo a rezultati se dobijaju u roku od 2 sata.

4 - REAGENSI I MATERIJAL

Opis	Količina
R1: Bočica sa 2,4 mL senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
R2: Bočica sa 1 mL nesenzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
BUF: Bočica sa 55 mL fosfatnog pufera pH 7,2	1
R3: Bočica sa 2 mL adsorbenta	1
CONTROL +: Bočica sa 0,2 mL titrirane pozitivne kontrole	1
CONTROL -: Bočica sa 0,2 mL negativne kontrole	1
MICROPLATE: Mikropločica sa poljima koja imaju U-dno	2
DROPPER: Specijalna kapaljka	2

5 - MERE PREDOSTROŽNOSTI

- Reagensi su predviđeni da se koriste isključivo za in vitro dijagnostiku i sa njima mora da rukuje ovlašćeno osoblje. Testovi su isključivo za jednokratnu upotrebu.
- Svi reagensi, osim reagensa **BUF**, sadrže sirovine životinjskog porekla i sa njima mora da se postupa oprezno.
- Uzorci su potencijalno infektivni. Pri rukovanju se mora pridržavati higijenskih uputstava koji su propisani za ovaj tip proizvoda u zemlji u kojoj se koristi.
- Reagensi **CONTROL** sadrži natrijum azid (<0.1%).
- Ne koristiti reagente nakon datuma isteka roka.
- Ne koristiti reagente sa različitim brojevima lota.
- Pre upotrebe serum i reagente temperirati na sobnu temperaturu.
- Pre upotrebe pažljivo promućkati reagente **R1** i **R2**.
- Prilikom doziranja reagenasa **R1** i **R2** proveriti da li kapaljka stoji potpuno vertikalno. Voditi računa da u kapima nema mehurića vazduha da bi se obezbedio konstantan volumen doziranja.

6 – SAKUPLJANJE I OBRADA UZORKA

Koristiti svež serum ili serum koji je čuvan na -20°C, koji ne pokazuje znake hemolize, zamućenosti ili kontaminacije.

Izbegavati višestruko zamrzavanje i odmrzavanje.

Ne razređivati serum.

7 - STABILNOST, ČUVANJE I PRIPREMA REAGENSA

Reagensi su spremni za upotrebu.

Svi reagensi koji se čuvaju u svom originalnom pakovanju na temperaturi od 2-8°C su stabilni sve do datuma isteka roka trajanja koji je naveden na kutiji. Ne zamrzavajte.

8 - NEOPHODAN MATERIJAL KOJI SE NE NALAZI U PROIZVODI

- Automatska pipeta sa volumenom doziranja prilagođenim volumenu koji će se meriti;
- Posude za odlaganje otpada;
- Centrifuga;
- Epruvete za hemolizu.

9 - NAČIN RADA

Pre upotrebe reagente ostaviti da postignu sobnu temperaturu.

9.1 - Priprema uzorka

Razblažiti serum koji treba da se testira u razmeri 1:40:

- 50 µL seruma;
- 1.95 mL **BUF** reagensa.

9.2 - Izvođenje testa na mikropločici

- Pomoću multikanalne mikropipete ispipetirati 50 µL **BUF** reagensa u 8 polja mikropločice.

- Pomoću mikropipete, dodati 50 µL razblaženog seruma u prvo polje. Izmešati serum sa **BUF** reagensom i napraviti serijska razblaženja, poželjno pomoću mikrodilutera, dodavanjem 50 µL iz prvog (1) u drugo (2) polje, zatim 50 µL iz drugog (2) u treće (3), i tako do šestog (6) polja. 50 µL iz šestog polja se odbacuje. Na ovaj način se dobije serija razblaženja od 1:80 do 1:2560.

- Dodati 50 µL razblaženog seruma u sedmo (7) polje. Izmešati serum sa **BUF** reagensom a zatim odbaciti 50 µL. Ovo razblaženje (1:80) predstavlja kontrolu seruma, i ima ulogu da detektuje prirodne anti-ovca aglutinine koji mogu biti prisutni u serumu uzoraka.

- Pažljivo promućkati reagente **R1** i **R2**.

- Dodati 1 kap **R1** reagensa u prvih 6 polja.
- Dodati 1 kap **R2** reagensa u sedmo polje (kontrola seruma).
- Dodati 1 kap **R1** reagensa u osmo polje (kontrola reagensa), koje ima ulogu da kontroliše valjanost **BUF** i **R1** reagenasa.

Napomena: Za svaku seriju testova raditi samo jednu kontrolu reagensa.

- Veoma pažljivo promućkati sadržaj u poljima:
 - Ručno, lateralno lupkati bočnu stranu mikropločice koja je stavljena na ravan radni sto;
 - Ili upotrebom vibracione mešalice za mikrotitracione ploče (npr. 1300 rpm, 10 sekundi). Ne koristiti orbitalnu mešalicu.
- Ostaviti pločicu da odstoji, dalje od bilo kog izvora vibracija.

- Pločica se može očitati nakon 2 časa.

9.3 - Adsorpcija prirodnih anti-ovca aglutinina u slučaju aglutinacije kontrole seruma

- Pažljivo promućkati reagens **R3**.
- U epruveti, dodati i promešati:
 - 0.1 mL seruma;
 - 0.3 mL **R3** reagensa.
- Inkubirati na sobnoj temperaturi 60 minuta.
- Centrifugirati na 2000 rpm 15 minuta.
- Sakupiti supernatant, serum je sada u razblaženju 1:4.
- Razblažiti supernatant u **BUF** reagensu u razmeri 1:10, dobije se razblaženi adsorbovani materijal (1:40).
- Pratiti korake opisane u odeljku "Izvođenje testa na mikropločici", ali razblaženi materijal zameniti razblaženim adsorbovanim materijalom.

10 - OČITAVANJE

Negativna reakcija: Odsustvo hemaglutinacije. Prisustvo više-manje velikog prstena na dnu polja.

pozitivna reakcija: Prisustvo hemaglutinacije. Prisustvo mutnog crveno-smeđeg taloga koji prekriva dno; ponekad je prisutna fina obodna ivica.

Primer: Serum pozitivan u razblaženju 1:1280



11 - TUMAČENJE REZULTATA

Titar < 1:160: **Beznačajna reakcija progresivne infekcije.** Može da ukaže na prethodnu ili lečenu infekciju. Ponoviti testiranje nakon 2 do 3 nedelje, takođe uraditi testiranje elektrosinerezom ili imunoelektroferezom.

Titar > 1:160: **Značajna reakcija.** Pretpostavka aktivne infekcije.

12 – INTERNA KONTROLA KVALITETA

Reagensi **CONTROL +** i **CONTROL –** se moraju tretirati kao test serumi. Titar reagensa **CONTROL +** mora biti isti kao titar koji je naznačen na bočici ± jedno razblaženje. Ne sme biti bilo kakve hemaglutinacije u reakciji **CONTROL –**. Ako je prisutna hemaglutinacija, test nije validan.

13 – UZROCI GREŠKE I OGRANIČENJA TESTA

- Loše čuvanje seruma.
- Loše čuvanje reagensa nakon prvog otvaranja.
- Koristiti isključivo kapaljke koje se nalaze u sastavu proizvoda.
- Ne koristiti istu kapaljku i za reagens **R1** i za **R2**.
- U slučaju pozitivne reakcije u prvih 6 polja, izvršiti dalje serijsko razblaživanje da bi se odredila granična vrednost titra hemaglutinacije.
- Kontrola seruma mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole biće neophodno ponoviti test pošto se iz seruma adsorpcijom odstrane prirodni anti-ovca aglutinini.
- Kontrola reagensa mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole, proizvod **ELI.H.A Schistosoma** ne može da se koristi.
- Određeni serumi sa visokom koncentracijom antitela mogu da daju povod za fenomen zone (sa nestajanjem zamućenja) u početnim razblaženjima koji iščezava u kasnijim razblaženjima.
- Kvalitet reagensa omogućava da se reakcija izvrši uveče a očitavanje testa sledećeg jutra pod uslovom da se mikropločica nikako ne pomeri a da bude zaštićena od bilo kog izvora vibracija.
- U svim slučajevima, neophodno je da se pre utvrđivanja konačne dijagnoze u potpunosti uzmu u obzir klinički, epidemiološki i biološki podaci.

14 - PERFORMANSE

Proizvod **ELI.H.A Schistosoma** se sastoji od crvenih krvnih zrnaca senzibilisanih visokopreciđenim antigenom *Schistosoma mansoni*, koji obezbeđuje specifičnost i senzitivnost indirektno hemaglutinacione reakcije.

Evaluacija performansi, izvršena na 63 pozitivna seruma (*Schistosoma haematobium* i *mansoni*) i 56 negativnih seruma, pokazala je osetljivost od 85.7% i specifičnost od 98.2%.

15 - ODLAGANJE OTPADA

Otpad treba odložiti u skladu sa sanitarnim pravilnicima i propisima koji važe za ovu vrstu proizvoda u zemlji u kojoj se koriste. Ukoliko se **BUF** reagens prospe, očistiti radnu površinu upijajućim papirom i isprati vodom. Ukoliko se na radnu površinu prospe serum ili neki drugi reagens, očistiti izbeljivačem i upijajućim papirom.

16 - LITERATURA

1. S. HOSHINO, M.-E. CAMARGO, L.-C. DA SILVA - Standardization of a haemagglutination test for schistosomiasis with formalin-treated human erythrocytes - The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Vol. 19, N°3, 463/470.
2. A. CAPRON, J. BIGUET, P. TRAN VAN KY, Y. MOSCHETTO - Immunological studies in various types of schistosomiasis - Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Lille, Lille, France.
3. J. TRIBOULEY, J. TRIBOULEY-DURET, M. APPRIOU, D. BERNARD, R. PAUTRIZEL - Application de la réaction d'hémagglutination passive au diagnostic sérologique de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* - Bull. Organ. Mond. Santé, 1976, Vol. 54, 695/702.
4. L. AHMED, A. DODIN - Valeur de la réaction d'hémagglutination passive dans la bilharziose - Bulletin de la société de Pathologie Exotique, 1977, N°5, 485/489.
5. P. AMBROISE-THOMAS, R. GRILLOT - L'hémagglutination indirecte dans le diagnostic des bilharzioses. Comparaison à l'immuno-fluorescence indirecte dans l'étude de 3624 sérums humains - Bulletin de la société de Pathologie Exotique, 1980, N°3, 277/288.
6. P. WATTRE, M. CAPRON, J.-P. DESSAINT, A. CAPRON - Apport de l'immunologie au diagnostic et au traitement des maladies parasitaires - Immunologie (II) - R.-P., 1980, 30, 15.
7. M. EL SAYED AZAB, E. ABBAS EL ZAYAT - Evaluation of purified antigens in haemagglutination test (IHA) for determination of cross reactivities in diagnosis of fascioliasis and schistosomiasis - Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 1996, Vol 26, N°3, 677-685.

ELITech MICROBIO
Parc d'Activités du Plateau
19 Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tel :04 94 88 55 00
Fax : 04 94 32 82 61