

ELI.H.A Amoeba

Serodijagnoza amebiase
indirektnom hemaglutinacijom

120 testova
(Ref. 66602)

8000100-SR-2025-07
Samo za in vitro dijagnostiku, isključivo za profesionalnu uporabu
Testovi su samo za jednokratnu uporabu.



1 – NAMENA
Amebiasa omogućava kvantitativno određivanje serumskih antitela *Entamoeba histolytica* indirektnom hemaglutinacijom.
Svaki kit omogućava da se uradi 120 testova ili 20 reakcija od 6 razblaženja.

2 – UVOD
Amebiasis je parazitna infekcija čiji je izazivac protozoa specifična za ljude: *Entamoeba histolytica*. Ona je jedina patogena ameba za čoveka. Serodijagnostika omogućava potvrdu infekcije amebom u jetri i plućima.

3 – PRINCIP
ELI.H.A Amoeba se zasniva na principu indirektno hemaglutinacije. Senzibilisana crvena krvna zrnca sastoje se od crvenih krvnih zrnaca ovcu prekrivenih antigenom *Entamoeba histolytica*. 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 ovcu (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 titriranog pozitivnog kontrolnog reagensa	1
CONTROL - : Bočica sa 0,2 mL negativnog kontrolnog reagensa	1
MICROPLATE : Mikropločica sa poljima koja imaju U-dno	2
DROPPER : Specijalna kapaljka	2

5 – MERE PREDOSTROŽNOSTI

- Reagensi su predviđeni da se koriste samo za *in vitro* dijagnostiku i sa njima mora da rukuje ovlašćeno osoblje.
- 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 sadrže natrijum azid (koncentracija < 0,1%). Natrijum azid koji se nalazi u reagensima može reagovati sa teškim metalima u cevima i formirati eksplozivna jedinjenja. Stoga se preporučuje da se reagensi ne bacaju u sudoperu i da se poštuju važeće preporuke i propisi za odlaganje otpada.
- Ne koristite reagense kojima je istekao rok važnosti.
- Ne koristite reagense sa različitim brojevima partija.
- Pre upotrebe pustite da serum i reagensi postignu sobnu temperaturu.
- Pre upotrebe pažljivo promućkajte reagense **R1** i **R2**.
- Kada dozirate reagense **R1** i **R2** proverite da li kapaljka stoji potpuno vertikalno. Proverite da u kapima nema mehurića vazduha da bi obezbedili konstantan volumen doziranja.

6 – SAKUPLJANJE I OBRADA UZORKA

Koristite svež serum ili serum koji je čuvan na -20 °C i ne pokazuje nikakve znake hemolize, zamućenosti ili kontaminacije.
Izbegavajte ponovno zamrzavanje i odmrzavanje.
Ne razredjivati serum.

7 – STABILNOST, ČUVANJE I PRIPREMANJE 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 –MATERIJAL KOJI JE POTREBAN ALI SE NE ISPORUČUJE UZ KIT

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

9 – NAČIN RADA

Pre upotrebe reagense ostaviti da postignu sobnu temperaturu.

9.1 – Priprema uzorka

- Razblažite 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 mikrokanalne pipete stavite 50 µL **BUF** reagensa u 8 polja mikropločice.
- Mikrokanalnom pipetom dodajte 50 µL seruma u 1. polje.
Izmešajte serum sa **BUF** reagensom i izvršite serijsko razblaživanje, po mogućstvu koristeći mikrodiluter, tako što ćete 50 µL iz 1. polja prebaciti u 2. polje, zatim 50 µL iz 2. polja u 3. polje i tako sve dok ne završite sa 6. poljem. Zatim se iz 6. polja uzima i baca 50 µL.
Na ovaj način dobijaju se razblaženja od 1:80 do 1:2560.
- Dodajte 50 µL razblaženog seruma u 7. polje.
Pomešajte serum sa **BUF** reagensom a zatim uzmite i bacite 50 µL.
Ovo razblaženje (1:80) je kontrola seruma čija je uloga da otkrije prirodne anti-aglutinine ovcu koji bi mogli da budu prisutni u određenim uzorcima seruma.
- Pažljivo promućkajte reagense **R1** i **R2**.
 - Dodajte po 1 kap reagensa **R1** u prvih 6 polja.
 - Dodajte 1 kap reagensa **R2** u 7. polje (kontrola seruma).
 - Dodajte 1 kap reagensa **R1** u 8. polje (kontrola reagensa) čija je uloga da kontroliše validnost reagensa **BUF** i **R1**.

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

- Veoma pažljivo promućkajte sadržaj u poljima:
 - ili ručno tako što ćete lateralno lupkati bočnu stranu mikropločice koja je postavljena na ravan radni sto
 - ili pomoću vibratora sa vibracionom pločom za mikropločice (na primer 10 sekundi na 1300 o/min). Ne koristite orbitalni vibrator.
- Sada ostavite pločicu da odleži daleko od svakog izvora vibracija.
- Pločica može da se očita posle 2 sata.

9.3 – Adsorpcija prirodnih anti-aglutinina ovcu u slučaju aglutinacije kontrole seruma

- Pažljivo promućkajte reagens **R3**.
- U epruvetu stavite i izmešajte:
 - 0,1 mL seruma
 - 0,3 mL reagensa **R3**.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 60 minuta.
- Centrifugirajte 15 minuta na 2000 o/min.
- Sakupite supernatant; serum je sada u razblaženju 1:4.
- Izvršite razblaživanje supernatanta u **BUF** reagensu u razmeri 1:10 da dobijete razblaženi adsorbovani materijal (1:40).
- Izvršite radnje opisane u «Izvođenje testa na mikropločici», ali razblaženi materijal zamenite 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.

Voorbeeld: serum positief op 1/1280



11 – TUMAČENJE REZULTATA

Titar < 1/80:	Negativna reakcija. Verovatno odsustvo infekcije tkiva amebom.
1:80≤Titar≤ 1:160:	Sumnjiva reakcija. Mora se uraditi kontrola sa elektrosinergijskom tehnikom, latex aglutinacionom tehnikom (ELITex Bicolor Amoeba) i indirektnom imunofluorescencom.
Titar ≥ 1:320:	Značajna reakcija koja potvrđuje prisustvo amebijase.

12 – INTERNA KONTROLA KVALITETA

Reagensi **CONTROL +** i **CONTROL –** moraju da se tretiraju kao test serumi. Titar reagensa **CONTROL +** mora da bude isti kao titar odštampan na etiketi bočice +/- jedno razblaženje. Kod reagensa **CONTROL –** ne sme da bude nikakve hemaglutinacije. Ukoliko je hemaglutinacija prisutna, test nije validan.

13 – UZROCI GREŠKE I OGRANIČENJA TESTA

- Loše čuvanje seruma.
- Loše čuvanje reagensa posle prvog otvaranja.
- Koriste se isključivo one kapaljke koje se nalaze u kitu.
- 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 ovcu kontrole biće neophodno ponoviti test pošto se iz seruma adsorpcijom odstrane prirodni anti-aglutinini ovcu.
- Kontrola reagensa mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ovcu kontrole, **ELI.H.A Amoeba** 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

ELI.H.A Amoeba se sastoji od crvenih krvnih zrnaca senzibilisanih antigenom *Entamoeba histolytica*, dobijenim akсениčnom kulturom, što osigurava specifičnost i osetljivost reakcije. Evaluacija je pokazala da test **ELI.H.A Amoeba** ima osetljivost od 93 % i specifičnost od 97 %.

15 – ODLAGANJE OTPADA

Otpad treba da se odloži 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. L.-S. DIAMOND - Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae - *J. Parasitol.*, 1968, 54(5), 1047-1056.
2. O. PRAKASH, B.-N. TANDON, I. BHALLA, A.-K. AY, V.-K. VINAYAK - Indirect hemagglutination and ameba-immobilization tests and their evaluation in intestinal and extraintestinal amebiasis - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 18(5), 670-675.
3. M.-N. MORRIS, S.-J. POWELL, R. ELSDON-DEW - Latex agglutination test for invasive amebiasis - *Lancet*, 1970, 27,1(7661), 1362-1363.
4. J. BOS, A.-A. EIJK, P.-A. STEERENBERG - Application of ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) in the sero-diagnosis of amebiasis - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69(4),440.
5. A. VOLLER, D.-E. BIDWELL, A. BARTLETT, R. EDWARDS - A comparison of isotopic and enzyme-immunoassays for tropical parasitic diseases - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 71(5), 431-437.
6. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, D. MONGET - Immunoenzyme (ELISA) diagnosis of parasitic diseases using a modified micromethod. Results for toxoplasmosis, amebiasis, trichinosis, hydatidosis and aspergillosis - *Bull. World. Health Organ.*, 1978, 56(5), 797-804.
7. D.-P. HARTMANN, E. GHADIRIAN, E. MEEROVITCH - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect hemagglutination (IHA) test in the serodiagnosis of experimental hepatic amebiasis - *J. Parasitol.*, 1980, 66(2), 344-345.
8. J.-O. OSISANYA, D.-C. WARHURST - Specific anti-amoebic immunoglobulins and the cellulose acetate precipitin test in *Entamoeba histolytica* infection - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 74(5), 605-608.
9. A. TANDON - Use of enzyme linked immunosorbent assay in intestinal and extra-intestinal amebiasis (amoebic liver abscess) - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1981, 75(4), 574-575.
10. J.-M. PINON, J. POIRRIEZ, G. REMY, H. LEPAN - Immunological studies in amebiasis: isotypic characterization of specific antibodies by enzyme-linked immunofiltration assay - *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 37(2), 290-295.
11. B.-M. GANDHI, M. IRSHAD, T.-C. CHAWLA, B.-N. TANDON - Enzyme linked protein-A : an ELISA for detection of amoebic antibody - *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1987, 81(2), 183-185.
12. R. ROBERT, C. MAHAZA, C. BERNARD, C. BUFFARD, J.-M. SENET - Evaluation of a new bicolored latex agglutination test for immunological diagnosis of hepatic amebiasis - *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28(6), 1422-1424.

Izvršene promjene Verzije u odnosu na prethodnu verziju su istaknute u svojoj boji.



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
http://www.elitechgroup.com