

ELI.H. A Amoeba / ELİ.H. A Amip

Amebiyazis serodiagnozu için indirekt hemaglutinasyon

120 testleri
(Seri no. 66602)

8000100-TR-2012-05

Yalnızca *in vitro* diagnostik kullanım içindir, sadece profesyonel kullanım içindir.
Tek kullanımlık testler.



1 - AMAC

ELI.HA Amip *Entamoeba histolytica* karşı serum antikorlarının indirekt hemaglutinasyon testi yoluyla nicel olarak belirlenmesini sağlar.
Her bir kit, 120 test veya 6 dilüsyondan 20 reaksiyon gerçekleştirilmesini mümkün kılar.

2 - GİRİŞ

Amebiyazis veya *Entamoeba* cinsin bir parçası ve anaerobik bir parazit protozoadır: *Entamoeba histolytica*. İnsanlar için patojen olan tek amiptir. Serodiagnoz sayesinde karaciğer ve pulmoner amip apsesini doğrulamak mümkündür.

3 - USUL

ELI.HA Amip indirekt hemaglutinasyon testi usulünü baz olarak alır. Koyun eritrositleri çözünebilir *Entamoeba histolytica* antijeni ile hassaslaştırılır. Serumda *Entamoeba histolytica* antikorların varlığı tespit edilirse, hassaslaştırılmış eritrositler kuyucuk dibinde kırmızı/kahverengi bir tabaka oluşturacak şekilde aglutine olur. Spesifik antikor yokluğunda ise bu eritrositler aglutine olmaz ve kuyucuğun dibinde halka benzeri bir tortu oluşmasına neden olur.
Hassaslaştırılmamış eritrositler, reaksiyonun spesifikliğini sağlar ve doğal anti-koyun aglutininlerine (Forsman heteroantikorları, infeksiyöz mononükleoz antikorları vs.) bağlı karışıklıkları ortadan kaldırılmasını mümkün kılar.
Reaksiyon bir U-mikroplakada gerçekleştirilir.
İşlem hızlı ve kolaydır. Sonuçlar 2 saat içinde alınır.

4 - REAKTİFLER VE MALZEME

Tanım	Miktar
R1: 2,4 mL hassaslaştırılmış eritrosit viyali	1
R2: 1 mL hassaslaştırılmamış eritrosit viyali	1
BUF: 55 mL fosfat tamponu pH 7,2 viyali	1
R3: 2 mL adsorban viyali	1
CONTROL + : 0,2 mL titre edilmiş pozitif kontrol viyali	1
CONTROL - : 0,2 mL negatif kontrol viyali.	1
MİKROPLAKA: U-mikroplaka	2
DAMLALIK: özel damlalık	2

5 - KULLANIM ÖNEMLERİ

- Reaktifler yalnızca *in vitro* tanı amaçlı kullanım içindir ve yetkili kişiler tarafından uygulanmalıdır.
- Testler tek kullanımlıktır.
- **BUF** reaktifi hariç tüm reaktifler, hayvansal kökenli maddeler içerir ve olağan önlemlerle kullanılmalıdır.
- Örneklerin bulaşıcı olma olasılığı vardır. Hijyen kurallarına ve kullanıldığı ülkede yürürlükte olan yönetmeliklere uyularak olağan önlemlerle uygulanmalıdır.
- Reaktifler sodyum azid içerir (konsantrasyon <=0,1).
- Reaktifleri son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Farklı partilerden reaktifler kullanmayın.
- Serum ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.
- Kullanmadan önce **R1** ve **R2** reaktifleri iyice çalkalayın.
- **R1** ve **R2** reaktiflerini dağıtırken damlalığın tamamen dikey olduğundan emin olun. Miktarların sabit olması için damlalarda hava kabarcığı olmadığını kontrol edin.

6 - NUMUNELERİN TOPLANMASI VE İŞLENMESİ

Taze veya -20°C'de saklanan ve bulanık hemoliz veya kontaminasyon göstermeyen serumlar kullanın.
Tekrar tekrar dondurup çözdüremek kaçının.
Serumu dekomplemente etmeyin.

7 - REAKTİFLERİN SAKLANMASI VE HAZIRLANMASI

Reaktifler kullanıma hazırdır.

Orijinal durumlarında 2-8°C'de saklanan reaktifler, kit üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir. Dondurulmaları gerekir.

8 - GEREKLİ OLAN ANCAK SAĞLANMAYAN MATERYALLER

- Ölçülecek miktara göre uyarlanmış pipetleme hacmine sahip otomatik pipet(ler);
- Kontamine atık kapları;
- Santrifüj
- Hemoliz tüpleri.

9 - YÖNTEM

Kullanımdan önce reaktifleri oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

9.1 - Numunenin hazırlanması

Test edilecek serumu 1/40'a kadar seyreltin:

- 50 µL serum;
- 1,95 mL **BUF** reaktifi.

9.2 - Testin mikropilaka üzerinde uygulanması

- Çok kanallı mikropipet kullanarak mikropilagin 8 kuyucuğuna 50'şer µL **BUF** reaktifini koyun.

- Bir mikropipet kullanarak, seyreltilmiş 50 µL serumu ilk kuyucuğa dağıtın.
BUF reaktifi ile karıştırın ve tercihen bir mikro seyreltici kullanarak kuyucuk içeriğinin 50 µL'sini ilk kuyucuktan ikinciye, ikinciden üçüncüye aktarın ve bu işlemi altıncı kuyucuğa kadar devam ettirin ve altıncı kuyucuğun içeriğinin 50 µL'sini dışarı atın.
Buylelikle 1:80 ila 1:2560'lık dilüsyonlar elde edilir.

- Yedinci kuyucuğa 50 µL serum stok dilüsyonu ekleyin.

BUF reaktifi ile karıştırın ve 50 µL dışarı atın.

Bu 1:80'lik dilüsyon, bazı serum örneklerinde bulunabilen doğal anti-koyun aglutininlerini saptayabilmek amacıyla serum kontrolü olarak kullanılır.

- **R1** ve **R2** reaktifleri dikkatlice çalkalayın.

- İlk 6 kuyucuğa birer damla **R1** reaktifi ekleyin.
- Serum kontrol kuyucuğu olan yedinci kuyucuğa bir damla **R2** reaktifi koyun.
- **BUF** ve **R1** reaktiflerinin kullanılabilirliğini kontrol etmek amacıyla sekizinci kuyucuğa (ayrıç kontrol kuyucuğu) bir damla **R1** reaktifi koyun.

Not: Her mikropilaka için sadece bir kuyucuk reaktif kontrolü kullanın.

- Kuyucuk içeriklerini dikkatlice homojenize edin:

- ya yere paralel tutulan mikropilagin kenarlarına hafifçe vurarak, manuel olarak;
 - ya da mikrotitre plakalar için titreşimli bir karıştırıcı kullanarak (örneğin 10 saniye boyunca 1300 devir/dakika). Orbital karıştırıcı kullanmayın.
- Sonrasında plak titreşimsiz, düz bir zemin üzerine yerleştirilerek hareketsiz kalmasını sağlayın.

- Reaksiyonu 2 saat sonra okuyun.

9.3 - Serum kontrolünün aglutinasyonu durumunda doğal anti-koyun aglutininlerinin adsorpsiyonu

- **R3** reaktifi dikkatlice çalkalayın.

- Bir tüpe koyun ve aşağıdakilerle karıştırın:

- 0,1 ml serum;
- 0,3 mL **R3** reaktifi.

- Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edin.

- 2000 rpm'de 15 dakika santrifüjleyin.

- Süpernatantı toplayın. Serum daha sonra 1/4 oranında seyreltin.

- Adsorbe edilmiş bir stok dilüsyonu (1/40) elde etmek için **BUF** reaktifinde süzünü 1/10 oranında seyreltin.

- Stok dilüsyonunu adsorbe edilmiş stok dilüsyonu ile değiştirerek "Testin mikropilaka üzerinde gerçekleştirilmesi" protokolünü tekrarlayın.

10 - SONUÇLARIN OKUNMASI

Negatif reaksiyon: Hemaglutinasyon eksikliği.

Kuyucuk dibinde küçük veya büyük çaplı daire şeklinde çokkelli varlığı.

Pozitif reaksiyon: Hemaglutinasyon varlığı.

Kuyucuk dibinde kırmızı/kahverengi bir tabaka varlığı; ayrıca ince bir periferel hattın varlığı.

Örnek: 1/1280'de serum pozitif



11 - SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Titre <1/80:

Negatif reaksiyon.

Olası doku Amebiyazis yokluğu.

1/80 ≤ Titre ≤ 1/160:

Güvenilmez reaksiyon.

Bir Kontrol, elektrosinez teknikleri ve lateks aglutinasyon teknikleri kullanılarak yapılmalıdır (**ELITex Bicolor Amip**) ve dolaylı immünofloresan teknikleri uygulanabilir.

Titre ≥ 1/320:

Viseral Amebiyazis lehine önemli reaksiyon.

12 - İÇ KALİTE KONTROLÜ

CONTROL+ ve **CONTROL-** reaktifleri analiz sırasında serum olarak ele alınmalıdır. **CONTROL+** reaktif titresi, flakon etiketinde belirtilen titreye ± bir dilüsyon ile eşit olmalıdır. **CONTROL-** reaktif hemaglutinasyon yokluğu göstermelidir. Aksi takdirde test geçersiz olur.

13 - HATALARIN NEDENLERİ VE TESTİN SINIRLAMALARI

- Serumun uygun olmayan koşullarda muhafaza edilmesi.
- Reaktiflerin açıldıktan sonra uygun olmayan koşullarda muhafaza edilmesi.
- Yalnızca kutu içinde verilen damlalıkları kullanın.
- **R1** ve **R2** reaktifleri arasında damlalıkları değiştirmeyin.
- İlk 6 kuyucukta pozitif reaksiyon olması durumunda, limit hemaglutinasyon titresini bulmak için dilüsyonları sürdürün.
- Kontrol serumu negatif reaksiyon (halka) vermezdir. Bu kontrolün hemaglutinasyonu durumunda, doğal anti-koyun aglutininleri adsorpsiyon yoluyla serumdan elimine edildikten sonra testi tekrarlamak gerekir.
- Ayrıç kontrolü negatif reaksiyon (halka) vermezdir. Bu kontrolün hemaglutinasyonu durumunda **ELI.HA Amip** reaktifi kullanılmalıdır.
- Antikor konsantrasyonunun çok yüksek olduğu belirli serumlarda, ilk dilüsyonda bir prozon fenomenine (açılınca) yol açabilir ve sonraki dilüsyonlarda kaybolabilir.
- Reaktiflerin kalitesi, mikropilakanın herhangi bir harekete maruz kalmaması ve titreşimlerden korunması koşuluyla, reaksiyonun aşkım yürütülmesini ve ertesi sabah okumayı mümkün kılar.
- Her durumda ve kesin tanı koyulmadan önce, testin yorumlanması, tüm klinik, epidemiyolojik ve biyolojik veriler ile diğer testlerin sonuçları birleştirilerek yapılmalıdır.

14 - PERFORMANSLAR

ELI.HA Amip *Entamoeba histolytica* antijeni tarafından hassaslaştırılmış eritrositlerden oluşur ve saf kültür (spirofritik veya patojenik mikroplardan arınmış bir kültür) ile elde edilir. Bu durum, reaksiyon için duyarlılığı ve özgüllüğü garanti eder.

ELI.HA Amip reaktif değerlendirme sonuçları böylece %93 duyarlılık ve %97 özgüllük gösterir.

15 - ATIKLARIN İHMASI

Atıklar, kullanım ülkesindeki bu gibi reaktifler için geçerli olan hijyen kurallarına ve yönetmeliklerine uygun olarak bertaraf edilmelidir.

BUF reaktifinin kazara dökülmesi durumunda: çalışma yüzeyini emici kağıtla temizleyin ve su ile durulayın. Serum veya başka bir reaktifin dökülmesi halinde: çamaşır suyu ve emici kağıt ile temizleyin.

16 - KAYNAKÇA

1. L.-S. DIAMOND - Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 ve *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 amoebiasis - *Lancet*, 1970, 27, 1(7661), 1362-1363.
4. J. BOS, A.-A. EUJK, 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: isotopic 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.

Önceki sürümdeki değişiklikler gri renkte vurgulanır.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

allée d'Athènes

83870 SIGNED

FRANSA

☎Tel: +33 (0) 4 94 88 55 00

Faks: +33 (0) 4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com

