

ELI.H.A *Echinococcus*

Serodiagnostika hydatidózy nepřímou hemaglutinací

102 testy.
(zn. 66604)



8000140-CS-2012-01

Pouze pro diagnostické použití *in vitro*, pouze pro profesionální použití.

Testy jsou určeny pro jednorázové použití.

1 - ÚČEL

ELI.H.A *Echinococcus* umožňuje kvantitativní stanovení sérových protilátek proti *Echinococcus granulosus* nepřímou hemaglutinací.

Sada umožňuje provést 102 testů nebo 17 reakcí ze 6 ředění.

2 - ÚVOD

Hydatidóza nebo echinokokóza je parazitární onemocnění, které odpovídá vývoji u prostředního hostitele, včetně člověka, larvy (hydatidy) cestoda rodu *Echinococcus*. Cyklus *Echinococcus granulosus* zahrnuje psa jako konečného hostitele a ovci nebo, méně často, člověka jako prostředního hostitele.

Lokalizace hydatidy na úrovni jater je nejčastější (50 až 70 %), následovaná plicní lokalizací (25 až 40 %).

Hydatidóza *Echinococcus granulosus* je charakterizována pomalostí evoluce a zákeřným tempem. Zůstává málo symptomatická a biologická diagnóza je v podstatě imunologická vyšetřením protilátek.

3 - PRINCIP

ELI.H.A *Echinococcus* je založen na principu nepřímé hemaglutinace.

Citlivé červené krvky se skládají z ovčích červených krvinek pokrytých antigenem *Echinococcus granulosus*.

Přítomnost protilátek anti-*Echinococcus granulosus* séra vede k aglutinaci senzibilizovaných červených krvinek, což se projevuje červenohnědým závojem pokrývajícím vnitřek misky. V nepřítomnosti specifických protilátek se tyto červené krvky usazují na dně misky ve formě kruhu. Nesenzibilizované červené krvky zajišťují specifitu reakce a umožňují eliminovat interferenci způsobenou přirozeným aglutininem proti ovčím (Forsman heteroantibodies, infekční mononukleózev protilátkám, ...).

Reakce se provádí na mikrotitrační destičce s dnem ve tvaru U.

Manipulace je rychlá a jednoduchá. Výsledky jsou k dispozici za 2 hodiny.

4 - ČINIDLA A ZAŘÍZENÍ

Popis	Množství
R1 : lahvička s 2,2 mL senzibilizovaných červených krvinek	1
R2 : lahvička s 1 mL nesenzibilizovaných červených krvinek	1
BUF : lahvička s 55 mL fosfátového pufru s pH 7,2	1
R3 : lahvička s 2 mL adsorbentu	1
CONTROL + : lahvička s 0,2 mL titrované pozitivní kontroly	1
CONTROL - : lahvička s 0,2 mL negativní kontroly	1
MICROPLATE : mikrotitrační destička s dnem ve tvaru U	2
DROPPER : speciální kapátko	2

5 - ZÁSADY BEZPEČNÉHO ZACHÁZENÍ

- Činidla jsou určena pouze pro diagnostiku *in vitro* a musí s nimi zacházet oprávněné osoby.
- Testy jsou určeny pouze pro jedno použití.
- Všechna činidla kromě činidla **BUF** obsahují látky živočišného původu a při manipulaci s nimi je nutné dodržovat zásady bezpečného zacházení.
- Vzorky jsou potenciálně infekční. Při manipulaci s nimi je nutné dodržovat zásady bezpečného zacházení, hygienická pravidla a předpisy platné v zemi použití.
- Lahvičky **CONTROL** obsahují azid sodný (koncentrace <0,1%).
- Nepoužívejte činidla po uplynutí data použitelnosti.
- Nepoužívejte činidla pocházející z různých šarží.
- Počkejte, až se sérum a činidla vyrovnají při pokojové teplotě.
- Činidla **R1** a **R2** před použitím důkladně protřepejte.
- Při dávkování činidel **R1** a **R2** se ujistěte, že kapátko je dokonale vertikální. Zkontrolujte, zda v kapkách nejsou vzduchové bubliny, aby byly dodané objemy konstantní.

6 - SBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKU

Použijte čerstvé nebo konzervované sérum při -20 °C bez hemolýzy zákalu nebo kontaminace.

Vyhnete se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Sérum nerozkládejte.

7 - OCHRANA A PŘÍPRAVA ČINIDEL

Činidla jsou připravena k použití.

Všechna činidla skladovaná při teplotě 2-8 °C jsou stabilní až do data použitelnosti uvedeného na krabici. Nezmrazujte.

8 - POTŘEBNÉ VYBAVENÍ, JEŽ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

- Automatická(é) pipeta(y) s objemem pipety, odpovídajícím měřenému množství;
- Nádoby na kontaminovaný odpad;
- Odstředivka;
- trubice na hemolýzu.

9 - POSTUP

Činidla před použitím vyrovnajte na pokojovou teplotu.

9.1 - Příprava vzorku

Zkušební sérum se zředí na 1/40:

- 50 µL séra;
- 1,95 mL činidla **BUF**.

9.2 - Provedení testu na mikrotitrační destičce

- Pomocí vícekanalové mikropipety dávkujte 50 µL činidla **BUF** do 8 misek mikrotitrační destičky.

- Pomocí mikropipety dávkujte 50 µL zředěného séra do 1. misky.

Smíchejte s činidlem **BUF** a přeneste, nejlépe za použití mikrorozpouštědla ("tulip"), 50 µL z 1.é misky do 2.éme, z 2.éme do 3.éme, a tak dále až do 6.éme misky, a odstraňte 50 µL z 6. misky.

Tímto způsobem se získají ředění 1/80 až 1/2560.

- 50 µL zředěného séra se dávkuje do 7. misky.

Smíchejte s činidlem **BUF** a odstraňte 50 µL.

Toto ředění (1/80) je sérová kontrola, jejíž úlohou je detekovat přírodní aglutininy proti ovčím, které mohou být obsaženy v některých sérech.

- Důkladně protřepejte činidla **R1** a **R2**.

- Vložte 1 kapku činidla **R1** do prvních šesti misek.
- Vložte 1 kapku činidla **R2** do 7. misky (sérová kontrola).
- Vložte 1 kapku činidla **R1** do 8. misky (kontrola činidla), jejíž úlohou je ověřit platnost činidla **BUF** a činidla **R1**.

Poznámka: Provedte pouze jednu kontrolu činidla na každou sérii testů.

- Velmi pečlivě homogenizujte obsah misek:

- buď ručně, poklepáváním ze strany na mikrotitrační destičku, položenou rovně;
- buď pomocí třepačkového míchadla pro mikrotitrační destičky (například 1300 otáček za minutu po dobu 10 sekund). Nepoužívejte orbitální třepačku.

- Destičku stále chráňte před vibracemi.

- odečtěte si reakci o 2 hodiny později.

9.3 - Adsorpce přírodních aglutinínů proti ovčím v případě aglutinace sérové kontroly

- Důkladně protřepejte činidlo **R3**.

- Nadávkujte do trubice a promíchejte:

- 0,1 mL séra;
- 0,3 mL činidla **R3**.

- Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě.

- Odstředějte při 2000 ot/min po dobu 15 min.

- Supernatant se shromáždí; sérum se pak zředí 1/4.

- Supernatant je zředěn 1/10 v činidle **BUF** aby se dosáhlo adsorpce nadřazeného ředění (1/40).

- Opakujte protokol "Provedení testu na mikrotitrační destičce" nahrazením nadřazeného ředění adsorbovaným ředěním.

10 - ČTENÍ

Negativní reakce: Absence hemaglutinace.

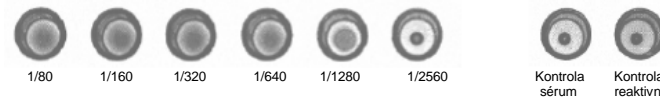
Přítomnost více či méně širokého prstence v dolní části šálku.

Positivní reakce:

Přítomnost hemaglutinace.

Přítomnost červenohnědého závoje pokrývajícího vnitřek misky; občas je přítomna jemný okrajový proužek.

Příklad: Sérum pozitivní na 1/1280



11 - VÝKLAD VÝSLEDKŮ

Titř < 1/160:

Reakce není významná.

Pravděpodobná absence hydatidózy.

Opakujte test za 2 až 3 týdny později a spojte s elektrosyntézou nebo imunoelektroforézou.

Titř = 1/160:

Pochybná reakce.

Zopakujte test o 2 až 3 týdny později a spojte elektrosyntézou nebo imunoelektroforézou.

Titř ≥ 1/320:

Silná reakce ve prospěch progresivní hydatidózy.

12 - VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

S činidly **CONTROL +** a **CONTROL -** by mělo být zacházeno jako se séry, která mají být analyzována. Titř činidla **CONTROL +** musí odpovídat titru uvedenému na štítku lahvičky při ± jednom ředění. Činidlo **CONTROL -** musí být bez hemaglutinace. Pokud tomu tak není, test není platný.

13 - PŘÍČINY CHYB A LIMITY TESTOVÁNÍ

- Špatné uchování séra.
- Nesprávné uchování činidel po otevření.
- Používejte pouze kapátka dodaná jako součást sady.
- Nezaměňujte kapátka mezi činidly **R1** a **R2**.
- V případě pozitivní reakce v prvních šesti miskách pokračujte v ředění, abyste zjistili limitní hemaglutinační titř.
- Sérová kontrola by měla poskytnout negativní reakci (kroužek). V případě hemaglutinace této kontroly je nezbytné opakovat test po odstranění přírodních aglutinínů proti ovčím ze séra adsorpcí.
- Reaktivní kontrola musí poskytnout negativní reakci (kroužek). V případě hemaglutinace této kontroly, činidlo **ELI.HA Echinococcus** nelze použít.
- Některé séra, jejichž koncentrace protilátek jsou velmi vysoká, mohou vyvolat zónový jev (se zasunutím závoje) do prvního ředění, který zmizí v následujících ředěních.
- Kvalita činidel umožňuje uskutečnit reakci večer a provést odečet následujícího rána za předpokladu, že mikrotitrační destičkou nebude pohybováno a že je chráněna před vibracemi.
- Ve všech případech a před stanovením konečné diagnózy musí být interpretace testu provedena integrací všech klinických, epidemiologických a biologických údajů a výsledků ostatních testů.

14 - VÝSLEDKY

ELI.HA Echinococcus se skládá z červených krvinek senzibilizovaných na antigen *Echinococcus granulosus*. Zajišťuje citlivost a specifitu reakce.

Studie 221 lidských sér prokázala citlivost 93,0 % (bez ohledu na umístění cyst) a specifitu 94,9 %. Srovnání s IFI a testem ELISA ukázalo pozoruhodnou komplementaritu těchto různých reakcí (2).

15 - LIKVIDACE ODPADU

Odpad musí být zlikvidován v souladu s hygienickými pravidly a předpisy platnými pro tento typ výrobku v zemi použití.

V případě náhodného rozlití činidla **BUF**, vyčistěte pracovní plochu absorpčním papírem a opláchněte vodu. Pokud se rozlije sérum nebo jiné činidlo, vyčistěte dezinfekčním přípravkem a absorpčním papírem.

16 - ODKAZY

1. A. CAPRON, L. YARZABAL, A. VERNES, J. FRUIT - Le diagnostic immunologique de l'échinococose humaine - *Path. - Biol.*, 1970, Vol. 18, n° 7-8, 357-368.
2. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L'hémagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de l'hydatidose. Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA - *Lyon Médical*, 1979, 241, 755-759.
3. P. WATTRE, M. CAPRON, A. BEKHTI, A. CAPRON - Diagnostic immunologique de l'hydatidose - *La nouvelle presse médicale*, 1980, 9, n°5, 305-309.
4. P. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, n°123, 417/55-60.

Změny z předchozí verze jsou zvýrazněny šedě.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎: 33 (0)4 94 88 55 00

Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com

