

ELI.H.A *Echinococcus*

Serodiagnostika hydatidózy nepřímou hemaglutinací

102 testy.
(zn. 66604)



8000140-CS-2025-07
Pouze pro diagnostické použití *in vitro*, pouze pro profesionální použití.
Testy jsou určeny pro jednorázové použití.

1 - ÚČEL
ELI.HA *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 krvinky se skládají z ovčích červenýchrvinek pokrytých antigenem *Echinococcus granulosus*.
Přítomnost protilátek anti-*Echinococcus granulosus* séra vede k aglutinaci senzibilizovaných červenýchrvinek, což se projevuje červenohnědým závojem pokrývajícím vnitřek misky. V nepřítomnosti specifických protilátek se tyto červené krvinky usazují na dně misky ve formě kruhu. Nesenzibilizované červené krvinky zajišťují specifitu reakce a umožňují eliminovat interferenci způsobenou přirozeným aglutininem proti ovčím (Forssman heteroantibodies, infekční mononukleóзовé protilátkám, ...).
Reakce se provádí na mikrotitrační destičce s dnem ve tvaru U.
Manipulace je rychlá a jednoduchá. Výsledky jsou k dispozici za 2 hodiny.

Popis	Množství
R1: lahvička s 2,2 mL senzibilovaných červenýchrvinek	1
R2: lahvička s 1 mL nesenzibilizovaných červenýchrvinek	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.
- Reagencie obsahují azid sodný (koncentrace < 0.1%). Azid sodný obsažený v činidlech může reagovat s těžkými kovy v potrubí za vzniku výbušných sloučenin. Proto se doporučuje činidla nevhazovat do dřezu a dodržovat platná doporučení a předpisy pro likvidaci odpadu.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí data použitelnosti.
- Nepoužívejte činidla pocházející z různých sarží.
- Před použitím nepoužívejte poškozená nebo nesprávně skladovaná činidla.
- 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 VZORKŮ
Používejte čerstvé nebo konzervované sérum při -20 °C bez hemolýzy zákalu nebo kontaminace.
Vyhňte 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. Nezmarazujte.
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 vyrovnejte 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 víceanálové 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 mikrozpouštědla ("tulip"), 50 µL z 1.^é misky do 2.^é, z 2.^é do 3.^é, a tak dále až do 6.^é 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 (kontrola sérová).
• Vložte 1 kapku činidla **R1** do 8. misky (kontrola činidla), jejíž úlohou je ověřit platnost činidla **BUF** a činidla **R1**.

Poznámka: Proveďte 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.

Pozitivní reakce: Přítomnost hemaglutinace.
Přítomnost červenohnědého závoje pokrývajícího vnitřek misky; občas je přítomna jemný okrajový prouzek.

Příklad: Sérum pozitivní na 1/1280



11 - VÝKLAD VÝSLEDKŮ
Titř < 1/160: Reakce není významná.
Pravděpodobná absence hydatidózy.
Zopakujte test o 2 až 3 týdny později a spojte elektrosyntézou nebo imunoelktroforézou.
Titř = 1/160: Pochybná reakce.
Zopakujte test o 2 až 3 týdny později a spojte elektrosyntézou nebo imunoelktroforézou.
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 uchovávání séra.
- Nesprávné uchovávání 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 červenýchrvinek 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 vodou. Pokud se rozlije serum 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'échinococcose 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
http://www.elitechgroup.com

