

ELI.H.A *Echinococcus*

Serodijagnostika hidatidoze pomoću testova neizravne

102 hemaglutinacije
(Réf. 66604)

8000140-HR-2012-01

Samo za *in vitro* dijagnostiku, isključivo za profesionalnu uporabu.
Testovi su samo za jednokratnu uporabu.



1 - CILJ

ELI.H.A *Echinococcus* omogućuje kvantitativno određivanje serumskih antitijela usmjerenih protiv *Echinococcus granulosus* pomoću postupka neizravne hemaglutinacije. Komplet omogućuje izvođenje 102 ispitivanja ili 17 reakcija 6 otopina.

2 - UVOD

Hidatidoza ili ehinokokoza je parazitska bolest koja nastaje u organizmu prijelaznog domaćina, uključujući čovjeka, razvojem ličinke (hidatidoza) jedne vrste parazita roda *Echinococcus*. Ciklus larve *Echinococcus granulosus* uključuje psa kao glavnog domaćina, ovce ili, rjeđe, čovjeka kao prijelaznog domaćina.

Lokalizacija hidatida u području jetre je najčešća (50 do 70%), nakon čega slijedi lokalizacija u području jetre (25 do 40%).

Hidatidozu uzrokovanu larvom ličinke parazita roda *Echinococcus granulosus* karakterizira usporenost i podmukao tempo njenog razvoja. Bolest je asiptomatska, a laboratorijska dijagnostika uglavnom je imunološko ispitivanje antitijela.

3 - NAČELO

ELI.H.A *Echinococcus* temelji se na načelu neizravne hemaglutinacije.

Osjetljiva crvena krvna zrnca sastoje se od crvenih krvnih zrnaca ovce prekrivenih antigenom *Echinococcus granulosus*.

Prisutnost antitijela u antiserumu *Echinococcus granulosus* dovodi do aglutinacije senzibiliziranih crvenih krvnih zrnaca, što rezultira crvenim / smeđim slojem koji prekriva posudicu. U odsutnosti specifičnih protutijela, ova crvena krvna zrnca se u obliku prstena talože na dnu posudice. Nesenzibilizirana crvena krvna zrnca osiguravaju specifičnost reakcije i omogućuju uklanjanje interferencija nastalih djelovanjem prirodnog anti-ovaca aglutinina (Forssman heteroantitijela, antitijela infektivne mononukleoze, itd.).

Reakcija se provodi na mikropločici s dnom u obliku slova "U". Rukovanje je jednostavno i brzo. Rezultati se dobivaju za 2 sata.

4 - REAGENSI I OPREMA

Opis	Količina
R1 :bočica zapremine 2,2 mL ispunjena senzibiliziranim crvenim krvnim zrcima	1
R2 : bočica zapremine 1 mL ispunjena senzibiliziranim crvenim krvnim zrcim	1
BUF : bočica zapremine 55 mL ispunjena fosfatnim puferom pH-vrijednosti 7,2	1
R3 : bočica zapremine 2 mL ispunjena adsorbensom	1
CONTROL + : bočica zapremine 0,2 mL ispunjena titriranom pozitivnim kontrolnim serumom	1
CONTROL - : bočica zapremine 0,2 mL negativnog kontrolnog seruma	1
MICROPLATE : mikropločica s dnom u obliku slova "U"	2
DROPPER : specijalna kapaljka	2

5 - MJERE OPREZA PRI UPORABI

- Reagensi su namijenjeni samo za dijagnozu *in vitro* i mogu ih koristiti samo ovlaštene osobe.
- Testovi su samo za jednokratnu uporabu.
- Svi reagensi osim reagensa **bufs** sadrže tvari životinjskog podrijetla i njima treba rukovati uz uobičajene mjere opreza.
- Uzorci su potencijalno zarazni. Obavezno rukovanje uz običajene mjere opreza u skladu s pravilima higijene i propisima koji su na snazi u zemlji uporabe.
- Bočice **CONTROL** sadrže natrijev azid (u koncentraciji < 0,1%).
- Nemojte koristiti reagentse kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti reagentse iz različitih šarži.
- Pričekajte da se serum i reagensi uravnoteže na sobnoj temperaturi.
- Temeljito protresite reagentse **R1** i **R2** prije uporabe.
- Tijekom raspodjele reagensa **R1** i **R2**, vodite računa da kapaljka bude u potpuno okomitom položaju. Provjerite nema li u kapima mjehurića zraka kako bi se doziranje volumena seruma vršilo bez prekida.

6 - PRIKUPLANJE I OBRADA UZORAKA

Koristite svježe ili serume konzervirane pri temperaturi od -20 °C, bez remećenja postupka hemolize ili kontaminacije. Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. Nemojte dekomplementirati serum.

7 - ČUVANJE I PRIPREMA REAGENSA

Reagensi su spremni za upotrebu.

Svi reagensi pohranjeni na temperaturi od 2-8 °C su stabilni do datuma isteka roka trajanja navedenog na kompletu. Ne smiju se zamrzavati.

8 - POTREBNI MATERIJALI KOJI SE NE ISPORUČUJU ZAJEDNO S KOMPLETOM

- Automatska pipeta/pipete volumena pipetiranja prilagođenog količini koja se mjeri;
- Spremnici za kontaminirani otpad;
- Centrifuga ;
- Cijevi za hemolizu.

9 - OPERATIVNI POSTUPAK

Prije upotrebe uravnotežite reagentse na sobnoj temperaturi.

9.1 - Priprema uzorka

Razrijedite serum koji će se testirati u omjeru 1/40:

- 50 µL seruma;
- 1,95 mL reagensa **BUF**.

9.2 - Postupak testiranja na mikroploči

- Koristeći višekanalnu mikropipetu, ulijte 50 µL reagensa **BUF** u 8 jažica na mikroploči.

- Koristeći mikropipetu, ulijte 50 µL razrijeđenog seruma u¹ posudicu.

Pomiješajte s reagensom **BUF** i prebacite, po mogućnosti pomoću mikro-razrjeđivača ("tulipan"), 50 µL sadržaja iz¹ posudice u², iz² u³, i tako dalje do⁶ posudice, izlijevajući 50 µL iz⁶ posudice.

Na taj način su dobivene su otopine 1/80 do 1/2560.

- Ulijte 50 µL razrijeđenog seruma u⁷ posudicu.

Pomiješajte s reagensom **BUF** i odlijte 50 µL.

Ova otopina (1/80) predstavlja kontrolni serum čija je uloga detektiranje prirodnih aglutinina protiv ovaca koje mogu sadržavati neki serumi.

- Temeljito protresite reagentse **R1** i **R2**.

- Stavite 1 kap reagensa **R1** u prvih 6 posudica.
- Stavite 1 kap reagensa **R2** u⁷ posudicu (kontrolni serum).
- Stavite 1 kap reagensa **R1** u⁶ posudicu (kontrolni reagens), čija je uloga provjera valjanosti reagensa **BUF** i reagensa **R1**.

Napomena : u jednoj seriji testova koristite samo jedan kontrolni reagens .

- Vrlo pažljivo homogenizirajte sadržaj posudica:

- bilo ručno, kucajući po bočnim stranicama mikroploče položene ravno;
- bilo korištenjem vibracijske mješalice za mikrotitar ploče (primjerice 1300 okretaja u minuti tijekom 10 sekundi). Nemojte koristiti orbitalnu tresilicu.

- Ostavite ploču da miruje, zaštićenu od svih vibracija.

- Pročitajte reakciju 2 sata kasnije.

9.3 - Adsorpcija prirodnih anti-ovaca aglutinina u slučaju aglutinacije kontrolnog seruma

- Temeljito protresite reagens **R3**.

- Ulijte u cijev i promiješajte:

- 0,1 mL seruma;
- 0,3 mL reagensa **R3**.

- Ostavite da inkubira 60 min na sobnoj temperaturi.

- Centrifugirajte na 2000 okretaja u minuti 15 minuta.

- Prikupite supernatant; serum je tako razrijeđen u omjeru 1/4.

- Razrijedite supernatant u omjeru 1/10 u reagensu **BUF** kako biste dobili slabo razrijeđenu adsorbiranu otopinu (1/40).

- Ponovite protokol "Testiranje na mikroploči zamjenom slabo razrijeđene otopine sa slabo razrijeđenom adsorbiranom otopinom.

10 - ČITANJE

Negativna reakcija :

Odsutnost hemaglutinacije.

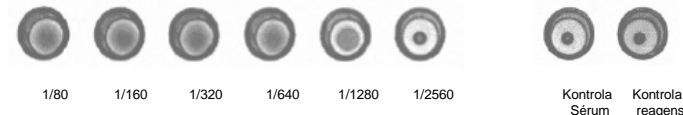
Prisutnost prstena veće ili manje širine na dnu posudice.

Pozitivna reakcija :

Prisutnost hemaglutinacije.

Prisutnost crvenog/smeđeg sloja koji prekriva posudicu; u nekim slučajevima označava prisutnost tanke periferne granice.

Primjer: Serum pozitivan na 1/1280



11 - INTERPRETACIJA REZULTATA

Titar < 1/160 :

Neznačajna reakcija .

Vjerojatna odsutnost hidatidoze.
Ponovite test za 2 do 3 tjedna te mu također pridružite elektrosintezu ili imunoelektroforezu.

Titar = 1/160:

Sumnjiva reakcija.

Ponovite test 2 do 3 tjedna kasnije i pridružite mu elektrosintezu ili imunoelektroforezu.

Titar ≥ 1/320 :

Značajna reakcija u korist progresivne hidatidoze.

12 - UNUTARNJA KONTROLA KVALITETE

Reagentse **CONTROL+** i **CONTROL-** treba tretirati kao serume za analizu. Titar reagensa **CONTROL +** mora biti jednak titru navedenom na etiketi bočice ± jedna otopina. Reagens **CONTROL-** treba predstavljati odsutnost hemaglutinacije. Ako to nije slučaj, test nije valjan.

13 - UZROCI POGREŠAKA I OGRANIČENJA TESTIRANJA

- Loš način čuvanja seruma.
- Nepravilno skladištenje reagensa nakon otvaranja.
- Koristite samo pipete koje se isporučuju u kutiji.
- Nemojte razmjenjivati pipete između reagensa **R1** i **R2**.
- U slučaju pozitivne reakcije u prvih 6 posudica, nastavite razrjeđivanje kako biste pronašli granični hemaglutinacijski titar.
- Kontrola seruma treba dati negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole, potrebno je ponoviti test nakon uklanjanja prirodnih anti-ovaca aglutinina iz seruma pomoću postupka adsorpcije.
- Reaktivna kontrola mora dati negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole, reagens **ELI.HA Echinococcus** ne može se koristiti.
- Neki serumi čija je koncentracija antitijela vrlo visoka, mogu dovesti do pojave zone (uz povlačenje sloja) u prvim otopinama, a koji nestaje u narednim otopinama.
- Kvaliteta reagensa omogućuje provedbu reakcije navečer i čitanje sljedećeg jutra, pod uvjetom da nije bilo nikakvih pomicanja mikroploče te da je bila zaštićena od vibracija.
- U svim slučajevima i prije postavljanja konačne dijagnoze, interpretacija testa mora se provesti uzimajući u obzir sve kliničke, epidemioške i biološke podatke i rezultate ostalih testova.

14 - IZVEDBE

ELI.H.A Echinococcus se sastoji od crvenih krvnih zrnaca senzibiliziranih antigenom *Echinococcus granulosus*. Osigurava osjetljivost i specifičnost reakcije.

Istraživanje provedeno na 221 ljudskom serumu je pokazalo osjetljivost od 93,0% (bez obzira na lokaciju ciste) i specifičnost od 94,9%. Usporedbe s testovima IFI i ELISA su pokazale izvanrednu komplementarnost ovih različitih reakcija (2).

15 - ODLAGANJE OTPADA

Otpad mora biti zbrinut u skladu s higijenskim pravilima i propisima koji su na snazi za ovu vrstu proizvoda u zemlji uporabe.

U slučaju slučajnog prolijevanja reagensa **BUF**, očistite radnu površinu upijajućim papirom i isperite vodom. U slučaju prolijevanja seruma ili nekog drugog reagensa, površinu očistite izbjeljivačem i papirnatim ručnikom.

16 - BIBLIOGRAFIJA

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.

Promjene u odnosu na prethodnu verziju su označene sivom bojom.

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

