ELI.H.A *Echinococcus*

Serodijagnostika hidatidoze pomoću testova neizravne

102 hemaglutinacije

(Réf. 66604)

8000140-HR-2025-07

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

1 - CILJ

ELI.HA *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.HA *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 zrncima	1
R2: bočica zapremine 1 mL ispunjena senzibiliziranim crvenim krvnim zrncim	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 **BUF** sadrže tvari životinjskog podrijetla i njima treba rukovati uz uobičajene mjerame 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.
- Reagensi sadrže natrijev azid (koncentracija < 0.1%). Natrijev azid sadržan u reagensima može reagirati s teškim metalima u cijevima i stvarati eksplozivne spojeve. Stoga se preporučuje da se reagensi ne bacaju u sudoper te da se slijede važeće preporuke i propisi za odlaganje otpada.
- Nemojte koristiti reagense kojima je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti reagense iz različitih šarži.
- Nemojte koristiti reagense koji su oštećeni ili nepropisno pohranjeni prije upotrebe.
- Pričekajte da se serum i reagensi uravnoteže na sobnoj temperaturi.
- Temeljito protresite reagense **R1** i **R2** prije uporabe.
- Tijekom raspodjele reagensa **R1** i **R2**, vodite računa da kapaljka bude u potpuno okomitom položajul. Provjerite nema li u kapima mjehurića zraka kako bi se doziranje volumena seruma vršilo bez prekida.

6 - PRIKUPLJANJE 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 reagense 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 u$^{1.}$ posudicu.
  Pomiješajte s reagensom **BUF** i prebacite, po mogućnosti pomoću mikro-razrjeđivača ("tulipan"), 50 µL sadržaja iz$^{1.}$ posudice u$^{2.}$, iz$^{2.}$ u$^{3.}$, i tako dalje do$^{6.}$ posudice, izlijevajući 50 µL iz$^{6.}$ posudice.
  Na taj način su dobivene su otopine 1/80 do 1/2560.

- Ulijte 50 µL razrijeđenog seruma u$^{7.}$ 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 reagense **R1** i **R2**.
  - Stavite 1 kap reagensa **R1** u prvih 6 posudica.
  - Stavite 1 kap reagensa **R2** u$^{7.}$ posudicu (kontrolni serum).
  - Stavite 1 kap reagensa **R1** u$^{8.}$ 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

1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560 Kontrola serum Kontrola reagens

11 - INTERPRETACIJA REZULTATA

Titar < 1/160 : **Neznačajna reakcija .**
Vjerojatna odsutnost hidatidoze.
Ponovite test 2 do 3 tjedna kasnije i pridružite mu 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

Reagense **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, epidemiološke 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
http://www.elitechgroup.com