

ELI.H.A Echinococcus

Serodijagnoza hidatidoze indirektnom hemaglutinacijom

102 testa

(Ref. 66604)

8000140-RS-2012-01

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



1 – NAMENA

ELI.H.A Echinococcus omogućava kvalitativno utvrđivanje anti-Echinococcus granulosis antitela serumima indirektnom hemaglutinacijom.

Svaki kit omogućava da se uradi 102 testa ili 17 reakcija od 6 razblaženja.

2 – UVOD

Hidatidoza ili ehinokokoza je parazitska bolest koju izazivaju larve (hidatidi) kestode roda Echinococcus. Životni ciklus Echinococcus granulosis-a zahteva i konačnog i prelaznog domaćina. U principu, konačan domaćin je pas a prelazni domaćin je ovca i u retkim slučajevima.

Hidatidi se najčešće nalaze u jetri (50 do 70%) a zatim u plućima (25 do 40%). Infekciju hidatidom E. granulosis-a karakteriše sporo i podmiklo napredovanje bolesti. Infekcija je relativno asimptomatična gde se biološka dijagnoza oslanja prvenstveno na otkrivanje antitela.

3 – PRINCIP

ELI.H.A Echinococcus se zasniva na principu indirektno hemaglutinacije. Senzibilisana crvena krvna zrnca sastoje se od crvenih krvnih zrnaca ovcе prekrivenih antigenom Echinococcus granulosis -a. Prisustvo anti-Echinococcus granulosis antitela serumima dovodi do aglutinacije senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca čiji je rezultat mutan crveno-smeđ talog koji prekriva polje. Kada specifična antitela nisu prisutna, crvena krvna zrnca stvaraju prstenasti talog na dnu polja. Nesenzibilisana crvena krvna zrnca obezbeđuju specifičnost reakcije što omogućava eliminaciju svakog uticaja prirodnih anti-aglutinitina ovcе (Forsmanova heteroantitela, antitela infektivne mononukleoze, itd.).

Reakcija se vrši na U-mikroplodici.

Rukovanje je jednostavno i brzo a rezultati se dobijaju u roku od 2 sata.

4 – REAGENSI I MATERIJAL

Opis	Količina
R1 : Bočica sa 2,2 mL senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
R2 : Bočica sa 1 mL nesenzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
BUF : Bočica sa 55 mL fosfatnog pufera pH 7,2	1
R3 : Bočica sa 2 mL adsorbenta	1
CONTROL + : Bočica sa 0,2 mL titriranog pozitivnog kontrolnog reagensa	1
CONTROL - : Bočica sa 0,2 mL negativnog kontrolnog reagensa	1
MICROPLATE : Mikroplodica sa poljima koja imaju U-dno	2
DROPPER : Specijalna kapaljka	2

5 – MERE PREDOSTROŽNOSTI

- Reagensi su predviđeni da se koriste samo za *in vitro* dijagnostiku i sa njima mora da rukuje ovlašćeno osoblje.
- Testovi su za jednokratnu upotrebu.
- Svi reagensi, osim reagensa BUF, sadrže sirovine životinjskog porekla i sa njima mora da se postupa oprezno.
- Uzorci su potencijalno zarazni. Sa njima se mora postupati uz uobičajene mere predostrožnosti, poštujući higijenska pravila i propise na snazi u zemlji upotrebe.
- reagensi CONTROL sadrže natrijum azid (<0,1%).
- Ne koristite reagentne kojima je istekao rok važnosti.
- Ne koristite reagentne sa različitim brojevima partija.
- Pre upotrebe pustite da serum i reagensi postignu sobnu temperaturu.
- Pre upotrebe pažljivo promućkajte reagentne R1 i R2.
- Kada dozirate reagentne R1 i R2 proverite da li kapalica stoji potpuno vertikalno. Proverite da u kapima nema mehurića vazduha da bi obezbedili konstantan volumen doziranja.

6 – SAKUPLJANJE I OBRADA UZORKA

Koristite svež serum ili serum koji je čuvan na -20°C i ne pokazuje nikakve znake hemolize, zamućenosti ili kontaminacije.

Izbegavajte ponovno zamrzavanje i odmrzavanje.

7 – STABILNOST, ČUVANJE I PRIPREMANJE REAGENSA

Reagensi su spremni za upotrebu.

Svi reagensi koji se čuvaju u svom originalnom pakovanju na temperaturi od 2-8°C su stabilni sve do datuma isteka roka trajanja koji je naveden na kutiji. Ne zamrzavajte.

8 – MATERIJAL KOJI JE POTREBAN ALI SE NE ISPORUČUJE UZ KIT

- Automatska pipeta sa volumenom doziranja prilagođenim volumenu koji će se meriti;
- Posude za odlaganje kontaminiranog otpada;
- Centrifuga;
- Epruvete za hemolizu.

9 – NAČIN RADA

Pre upotrebe pustite reagentne da dobiju sobnu temperaturu.

9.1 – Priprema uzorka

- Razblažite serum koji treba da se testira u razmeri 1:40:
 - 50 μL seruma
 - 1,95 mL BUF reagensa.

9.2 – Izvođenje testa na mikroplodici

- Pomoću mikrokanalne pipete stavite po 50 μL BUF reagensu u 8 polja mikroplodice.

Mikrokanalnom pipetom dodajte 50 μL seruma u 1. polje. Izmešajte serum sa BUF reagensom i izvršite serijsko razblaživanje, po mogućstvu koristeći mikrodiluter, tako što ćete 50 μL iz 1. polja prebaciti u 2. polje, zatim 50 μL iz 2. polja u 3. polje i tako sve dok ne završite sa 6. poljem. Zatim se iz 6. polja uzima i baca 50 μL. Na ovaj način dobijaju se razblaženja od 1:80 do 1:2560.

- Dodajte 50 μL razblaženog seruma u 6. polje. Pomešajte serum sa BUF reagensom a zatim uzmite i bacite 50 μL. Ovo razblaženje (1:80) je kontrola seruma čija je uloga da otkrije prirodne anti-aglutinitine ovcе koji bi mogli da budu prisutni u određenim uzorcima seruma.

- Pažljivo promućkajte reagentne R1 i R2.

- Dodajte po 1 kap reagensa R1 u prvih 6 polja.
- Dodajte 1 kap reagensa R2 u 7. polje (kontrola seruma).
- Dodajte 1 kap reagensa R1 u 8. polje (kontrola reagensa) čija je uloga da kontroliše validnost reagensa BUF i R1.

Napomena: Za svaku seriju testova radite samo jednu kontrolu reagensa.

- Veoma pažljivo promućkajte sadržaj u poljima:
 - ili ručno tako što ćete lateralno lupkati bočnu stranu mikroplodice koja je stavljena na ravan radni sto
 - ili pomoću vibratora sa vibracionom pločom za mikroplodice (na primer 10 sekundi na 1300 o/min). Ne koristite orbitalni vibrator.

- Sada ostavite pločicu da odleži daleko od svakog izvora vibracija.

- Pločica može da se očita posle 2 sata.

9.3 – Adsorpcija prirodnih anti-aglutinitina ovcе u slučaju aglutinacije kontrole seruma

- Pažljivo promućkajte reagentne R3.
- U epruvetu stavite i izmešajte:
 - 0,1 mL seruma
 - 0,3 mL reagensa R3.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 60 minuta.
- Centrifugirajte 15 minuta na 2000 o/min.
- Sakupite supernatant; serum je sada u razblaženju 1:4.
- Izvršite razblaživanje supernatanta u BUF reagensu u razmeri 1:10 da dobijete razblaženi adsorbovani materijal (1:40).
- Izvršite radnje opisane u «Izvođenje testa na mikroplodici», ali razblaženi materijal zamenite razblaženim adsorbovanim materijalom.

10 – OČITAVANJE

Negativna reakcija: Odsustvo hemaglutinacije.

Prisustvo više-manje velikog prstena na dnu polja.

Pozitivna reakcija: Prisustvo hemaglutinacije.

Prisustvo mutnog crveno-smeđeg taloga koji prekriva dno; ponekad je prisutna fina obodna ivica.

Primer: Serum pozitivan u razblaženju

1:1280



11 – TUMAČENJE REZULTATA

Titir < 1:160 Reakcija koja nije značajna.
Verovatno odsustvo hidatidoze.
Ponoviti test posle 2 do 3 nedelje i takođe uraditi test elektrosinereze ili imunoelektroforeze.

Titir = 1:160: Sumnjiva reakcija.
Ponoviti test posle 2 do 3 nedelje i takođe uraditi test elektrosinereze ili imunoelektroforeze.

Titir ≥ 1:320: Značajna reakcija koja potvrđuje progresivnu hidatidozu.

12 – INTERNA KONTROLA KVALITETA

Reagensi CONTROL + i CONTROL – moraju da se tretiraju kao test serumi. Titir reagensa CONTROL + mora da bude isti kao titir odštampan na etiketi bočice +/- jedno razblaženje. Kod CONTROL – reagensa ne sme da bude nikakve hemaglutinacije. Ukoliko je hemaglutinacija prisutna, test nije validan.

13 – UZROCI GREŠKE I OGRANIČENJA TESTA

- Loše čuvanje seruma.
- Loše čuvanje reagensa posle prvog otvaranja.
- Koriste se isključivo one kapaljke koje se nalaze u kitu.
- Ne koristiti istu kapaljku i za reagentne R1 i za R2.
- U slučaju pozitivne reakcije u prvih 6 polja, izvršiti dalje serijsko razblaživanje da bi se odredila granična vrednost titra hemaglutinacije.
- Kontrola seruma mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole biće neophodno ponoviti test pošto se iz seruma adsorpcijom odstrane prirodni anti-aglutinitini ovcе.
- Kontrola reagensa mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole, ELI.H.A Echinococcus ne može da se koristi.
- Određeni serum i visokom koncentracijom antitela mogu da daju povod za fenomen zone (sa nestajanjem zamućenja) u početnim razblaženjima koji iščezava u kasnijim razblaženjima.
- Kvalitet reagensa omogućava da se reakcija izvrši uveče a očitavanje testa sledećeg jutra pod uslovom da se mikroplodica nikako ne pomeri i da bude zaštićena od bilo kog izvora vibracija.
- U svim slučajevima, neophodno je da se pre utvrđivanja konačne dijagnoze u potpunosti uzmu u obzir klinički, epidemiološki i biološki podaci.

14 – PERFORMANSE

ELI.H.A Echinococcus se sastoji od crvenih krvnih zrnaca senzibilisanih antigenom Echinococcus granulosis -a koji obezbeđuje specifičnost i senzitivitet indirektno hemaglutinacione reakcije. Studija sprovedena na 221 uzorku humanog seruma pokazala je da je test pokazao osetljivost od 93,0% (bez obzira na mesto hidatidnih cisti) i specifičnost od 94,9%. Upoređivanje sa IFA i ELISA testovima pokazalo je značajan stepen komplementarnosti između ovih različitih reakcija.

15 – ODLAGANJE OTPADA

Otpad treba da se odloži u skladu sa sanitarnim pravilnicima i propisima koji važe za ovu vrstu proizvoda u zemlji u kojoj se koriste.

Ukoliko se BUF reagensi prospe, očistiti radnu površinu upijajućim papirom i isprati vodom.

Ukoliko se na radnu površinu prospe serum ili neki drugi reagens, očistiti izbeljivačem i upijajućim papirom.

16 – LITERATURA

- 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.
- P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L'hémagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de l'hydaticose. Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA - *Lyon Médical*, 1979, 241, 755-759.
- P. WATTRE, M. CAPRON, A. BEKHTI, A. CAPRON - Diagnostic immunologique de l'Hydatidose - *La nouvelle presse médicale*, 1980, 9, n°5, 305-309.
- P. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, n°123, 417/55-60.

Izvršene promjene Verzije u odnosu na prethodnu verziju su istaknute u sivoj boji.

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

