

**ELI.H.A *Schistosoma***  
**Sérodiagnostika bilharziózy pomocí nepřímé hemaglutinace**  
**120 testů**  
(kat. č. 66600)



verze: 8000120-en-2010-02

### 1- ÚČEL

**ELI.H.A *Schistosoma*** umožňuje kvantitativní určení sérových protilátek nepřímou hemaglutinací u pacientů trpících bilharziózou způsobenou *Schistosoma mansoni* (intestinální forma), *Schistosoma haematobium* (urinární forma) a *Schistosoma intercalatum* (rektální forma).

Každá souprava je určena pro provedení 120 testů nebo 20 reakcí po 6 ředěních.

### 2- ÚVOD

Bilharzióza, nebo schistosomiáza, reprezentuje skupinu parazitických onemocnění způsobených nečlánkovanými plochými červy rodu *Schistosoma*. Imunita je progresivně získána v přítomnosti dospělých červů. Nicméně patogenní částicí této nemoci jsou vajíčka. Nemoc probíhá ve třech po sobě jdoucích fázích: kontaminace – invaze – stadium nemoci. Diagnóza bilharziózy může být provedena dle identifikace vajíček, ale ta nemusí být detekována před fází „stadia onemocnění“. Imunologická diagnostika parazita je proto v úvodních stádiích onemocnění nezbytná.

### 3- PRINCIP

**ELI.H.A *Schistosoma*** je založena na principu nepřímé hemaglutinace. Senzibilizované erythrocyty jsou beranými erythrocyty potaženými antigenem *Schistosoma mansoni*. Přítomnost specifických sérových protilátek vede k aglutinaci senzibilizovaných erythrocytů projevující se jako kalná červeno/hnědá usazenina potahující jamku. V nepřítomnosti specifických protilátek vytvoří erythrocyty usazeninu ve tvaru prstence na dně jamky.

Nesenzibilizované erythrocyty zajišťují specifičnost reakce, což umožňuje vyloučit jakoukoliv interferenci způsobenou přirozenými anti-ovčímí aglutininy (Forssman heteroprotilátky, protilátky infekční mononukleózy). Reakce se provádí na mikrotitrační destičce tvaru U. Provádění testu je snadné a rychlé, s výsledkem do 2 hodin.

### 4 – REAGENCIE A MATERIÁL

Popis	Množství
<b>R1</b> : Lahvička s 2.2 ml senzibilizovaných erythrocytů	1
<b>R2</b> : Lahvička s 1 ml nesenzibilizovaných erythrocytů	1
<b>BUF</b> : Lahvička s 55 ml fosfátového pufru pH 7.2	1
<b>R3</b> : Lahvička s 2 ml adsorbentu	1
<b>CONTROL +</b> : Lahvička s 0.2 ml titrované pozitivní kontroly	1
<b>CONTROL -</b> : Lahvička s 0.2 ml negativní kontroly	1
<b>MICROPLATE</b> : Mikrotitrační destičky s U-dnem	2
<b>DROPPER</b> : Speciální kapátko	2

### 5- OPATŘENÍ

- Reagencie jsou určeny pouze pro *in vitro* použití a musí s nimi manipulovat pouze školený personál.
- Všechny reagencie kromě **BUF** reagencie obsahují surový materiál živočišného původu a musí s nimi být zacházeno s opatrností.
- Vzoroky pacientů jsou potenciálně infekční; musí s nimi být zacházeno opatrně, v souladu s hygienickými pravidly a aktuálními předpisy pro daný typ produktu a zemi jeho použití.
- **CONTROL** reagencie obsahují azid sodný (< 0.1 %).
- Nepoužívejte reagencie po datu expirace.
- Nepoužívejte reagencie různých čísel šarží.
- Nechejte reagencie a sérum před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Před použitím reagencie **R1** a **R2** opatrně protřepejte.
- Při dávkování reagencie **R1** a **R2** se ujistěte, kapátko máte zcela vertikálně. Ověřte nepřítomnost vzduchových bublin v kapkách kvůli zajištění stálého objemu kapky.

### 6 – ODBĚR VZORKŮ A JEJICH OŠETŘENÍ

Používejte čerstvé sérum nebo sérum skladované při -20°C, a takové, které nevykazuje známky hemolýzy, zakalení nebo kontaminace.

Vyvarujte se opakovanému zamrazování a rozmrazování.

Neodstraňujte komplement ze séra.

### 7– STABILITA, SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagencie jsou připraveny k použití.

Všechny reagencie uchovávané při 2-8°C v původním obalu jsou stabilní do data expirace uvedeného na krabici. Nezamrazujte.

## **8- POŽADOVANÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL**

- Automatická pipeta s objemem pipetování přizpůsobeným odměřenému objemu;
- Nádoba na odpadní materiál;
- Centrifuga;
- Hemolyzační zkumavky.

## **9-METODA**

Nechejte před použitím všechny reagensie vytemperovat na pokojovou teplotu.

### **9.1- Příprava vzorků**

Provedte ředění testovaného séra 1:40:

- 50  $\mu$ l séra;
- 1.95 ml **BUF** reagensie.

### **9.2- Realizace testu na mikrodestičce**

- S použitím multikanálové pipety přidejte 50  $\mu$ l **BUF** reagensie do 8 jamek mikrodestičky.
- S použitím mikropipety přidejte 50  $\mu$ l ředěného séra do 1. jamky. Smíchejte sérum s **BUF** reagensií a proveďte sériové ředění, nejlépe pomocí mikrodilutoru a to přenesením 50  $\mu$ l z 1. jamky do 2. jamky, potom 50  $\mu$ l z 2. jamky do 3. jamky a tak dále dokud nedojdete do 6. jamky. 50  $\mu$ l z 6. jamky je zlikvidováno. Tímto způsobem získáte ředění 1:80 až 1:2560.
- Přidejte 50  $\mu$ l ředěného séra do 7. jamky. Smíchejte sérum s **BUF** reagensií a odstraňte 50  $\mu$ l. Toto ředění (1:80) je kontrola séra, jejíž rolí je detekce přirozených anti-ovčích aglutininů, které se v některých vzorcích mohou vyskytnout.
- Opatrně protřepejte reagensie **R1** a **R2**.
  - Přidejte 1 kapku **R1** reagensie do prvních 6 jamek.
  - Přidejte 1 kapku **R2** reagensie do 7. jamky (kontrola séra).
  - Přidejte 1 kapku **R1** reagensie do 8. jamky (reagenční kontrola), jejíž rolí je kontrola validity reagensií **BUF** a **R1**.

Poznámka: Na každou sérii testů proveďte pouze jednu reagenční kontrolu.

- Velmi opatrně promíchejte obsah jamek:
  - Bud' ručně, poklepáváním na stranu mikrodestičky, která je položená naplocho na stole;
  - Nebo použitím vibrační třepačky pro mikrotitrační destičky (například 1300 rpm po dobu 10 sekund). Nepoužívejte orbitální třepačku.
- Nyní nechejte destičku ležet stranou od zdroje vibrací.
- Destičku lze odečítat po 2 hodinách.

### **9.3- Adsorpce přirozených anti-ovčích aglutininů v případě aglutinace sérové kontroly**

- Opatrně protřepejte reagensii **R3**.
- Do zkumavky přidejte a promíchejte:
  - 0.1 ml séra;
  - 0.3 ml **R3** reagensie.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 60 minut.
- Centrifugujte při 2000 rpm po dobu 15 minut.
- Odeberte supernatant; sérum je nyní naředěno 1:4.
- Proveďte ředění supernatantu 1:10 v **BUF** reagensii pro získání zásobního adsorbovaného ředění (1:40).
- Postupujte dle kroků popsanych v "Realizace testu na mikrodestičce", ale zaměňte zásobní ředění séra za adsorbované zásobní ředění.

## **10-ODEČTÁNÍ**

### **Negativní reakce**

### **Absence hemaglutinace**

Přítomnost většího nebo menšího prstence na dně jamky.

### **Pozitivní reakce**

### **Přítomnost hemaglutinace**

Přítomnost zakalené červeno/hnědé usazeniny potahující jamku; někdy je zde přítomný jemné periferní hranice.

Příklad: sérum je pozitivní v ředění 1:1280



## 11 – INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

**Titř < 1:160:** Žádná významná reakce progresivní infekce.

Může odpovídat dřívější nebo léčené infekci.

Opakujte test po 2 až 3 týdnech a rovněž proveďte elektrosynerézu nebo imunoelektroforézu.

**Titř ≥ 1:160:** Významná reakce.

Pravděpodobnost aktivní infekce.

## 12– INTERNÍ KONTROLA KVALITY

**CONTROL +** a **CONTROL –** reagensie se musí ošetřit jako testovaná séra. Titř reagensie **CONTROL +** musí být stejný jako titř vytištěný na štítku lahvičky ± jedno ředění. Nesmí se objevit hemaglutinace **CONTROL –**. Pokud je hemaglutinace přítomná, je test neplatný.

## 13– PŘÍČINY CHYB A LIMITY TESTU

- Špatné skladování séra.

- Špatné skladování reagensií po otevření.

- Používejte pouze kapátka dodávané se soupravou.

- Nezaměňujte kapátka mezi reagensiemi **R1** a **R2**.

- V případě pozitivní reakce v prvních 6 jamkách proveďte další sériové ředění kvůli určení konečného titru hemaglutinace.

- Kontrola séra musí být negativní (prsteneč). V případě hemaglutinace této kontroly je nezbytné znovu provést test po eliminaci přirozených anti-ovčích aglutininů adsorpcí.

- Reagenční kontrola musí být negativní (prsteneč). V případě hemaglutinace této kontroly nelze test **ELI.H.A Schistosoma** použít.

- Některá séra, u kterých je vysoká koncentrace protilátek, mohou poskytovat zónový fenomén (bez zakalení) v úvodních ředěních, který se neobjevuje v dalších ředěních.

- Kvalita reagensií umožňuje provést test večer a odečíst reakci druhý den ráno, v případě že mikrodestička je zcela v klidu a je chráněna před zdroji vibrací.

- Ve všech případech je nezbytné, aby pro stanovení konečné diagnózy byla brána v potaz klinická, epidemiologická a biologická data.

## 14- FUNKČNOST

**ELI.H.A Schistosoma** sestává z červených krvinek senzibilizovaných vysoce purifikovaným antigenem *Schistosoma mansoni*, který zajišťuje specifičnost a citlivost reakce nepřímé hemaglutinace. Hodnocení ukázalo, že test má citlivost 84,4 % a specifičnost 96,9 %.

## 15– LIKVIDACE ODPADU

Odpad je třeba likvidovat v souladu s hygienickými pravidly a aktuálními směrnici pro tento typ produktu v zemi jeho použití. V případě náhodného vylití **BUF** reagensie, očistěte pracovní plochu absorpční utěrkou a vodou. Pokud se na pracovní plochu vylije sérum nebo jiná reagensie, použijte absorpční papír a přípravek s chlorem.

## 16 - LITERATURA

1. S. HOSHINO, M.-E.CAMARGO, L.-C. DA SILVA - Standardization of a haemagglutination test for schistosomiasis with formalin-treated human erythrocytes - *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol. 19, N°3, 463/470.
2. A. CAPRON, J. BIGUET, P. TRAN VAN KY, Y. MOSCHETTO - Immunological studies in various types of schistosomiasis - *Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Lille, Lille, France*.
3. J. TRIBOULEY, J. TRIBOULEY-DURET, M. APPRIOU, D. BERNARD, R. PAUTRIZEL - Application de la réaction d'hémagglutination passive au diagnostic sérologique de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* - *Bull. Organ. Mond. Santé*, 1976, Vol. 54, 695/702.
4. L. AHMED, A. DODIN - Valeur de la réaction d'hémagglutination passive dans la bilharziose - *Bulletin de la société de Pathologie Exotique*, 1977, N°5, 485/489.
5. P. AMBROISE-THOMAS, R. GRILLOT - L'hémagglutination indirecte dans le diagnostic des bilharzioses. Comparaison à l'immuno-fluorescence indirecte dans l'étude de 3624 sérums humains - *Bulletin de la société de Pathologie Exotique*, 1980, N°3, 277/288.
6. P. WATTRE, M. CAPRON, J.-P. DESSAINT, A. CAPRON - Apport de l'immunologie au diagnostic et au traitement des maladies parasitaires - *Immunologie (II) - R.P.*, 1980, 30, 15.
7. M. EL SAYED AZAB, E. ABBAS EL ZAYAT – Evaluation of purified antigens in haemagglutination test (IHA) for determination of cross reactivities in diagnosis of fascioliasis and schistosomiasis – *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 1996, Vol 26, N°3, 677-685.

