

DIAGNOSTICKÉ SOUPRAVY**2 x 25 testů****Kat. č. SO 301**

Návod k použití

ITEST ASO**souprava pro titraci antistreptolysinu O v séru****Význam a použití**

Souprava ITEST ASO je určena k titraci antistreptolysinu O (ASO) v sérech. ASO je protilátka proti streptolysinu O (SLO) - extracelulárnímu produktu streptokoků skupiny A (1). Prožití streptokokové infekce se tedy projeví vzestupem hladiny ASO. Tyto infekce jsou závažné zejména svými následky - akutní revmatickou horečkou a akutní glomerulonefritidou.

Stanovení titru ASO je proto nezbytným doplňkem diagnostiky těchto onemocnění. Titraci ASO lze poměrně dobře standardizovat a protilátky lze určovat kvantitativně (2).

Vzhledem k obrovské četnosti streptokokových infekcí lze též používat titrace ASO jako "screeningové" metody pro zjišťování nedostatečné reaktivity imunitního systému.

Souprava ITEST ASO umožňuje rychlé a jednoduché provedení testu, protože dodávaný SLO obsahuje předem stanovený počet mezinárodních jednotek (m.j.).

Souprava obsahuje všechny reagensy potřebné k provedení testu, mimo králíčích erytrocytů. Ty je možno objednat samostatně (kat. č. SO 306).

Princip testu

Principem testu je neutralizace SLO protilátkou (ASO) přítomnou v séru. Zbýlý SLO se prokáže hemolýzou přidaných erytrocytů. Aby hemolýza proběhla, musí být SLO v redukovaném stavu.

Obsah soupravy**1. kat. č. SO 302 Streptolysin O**

Purifikovaný filtrát kultury streptokoka sk. A produkujícího SLO v lyofilizované formě. Lahvička obsahuje počet m.j. deklarovaný na štítku.

2. kat. č. SO 303 Redukční činidlo

Redukční činidlo – dithionitan sodný. 20 mg v lahvičce.

3. kat. č. SO 304 Koncentrovaný pufovaný fyziologický roztok s albuminem (PFR+A)

Lahvička obsahuje 8 ml koncentrovaného fyziologického roztoku s fosfátovým puforem a hovčím albuminem. Roztok je konzervován 0,1% azidem sodným.

4. kat. č. 305 Antistreptolysin O Standard (Sérum o známém titru)

Purifikovaný lidský IgG testovaný na přítomnost HIV, HBsAg a HCV s negativním výsledkem. Lahvička obsahuje počet m.j. deklarovaný na štítku.

Poznámka: Králíčí erytrocyty v Alseverově roztoku (25% suspenze, 40 nebo 20 ml) jsou dodávány samostatně (k.č. SO 306 nebo SO 307).



Provedení testu

Národní referenční laboratoř pro streptokoky a enterokoky SZÚ v Praze doporučuje následující metodu (3):

1. Příprava pufrovaného fyziol. roztoku s albuminem (PFR+A)

Obsah lahvičky s koncentrovaným PFR+A (8 ml) naředte 112 ml destilované vody. Získáte 120 ml roztoku o pH \pm 6,5 (pH roztoku překontrolujte a v případě potřeby upravte). Takto připravený roztok uchovávejte při 2 - 8°C a spotřebujte do sedmi dnů.

2. Příprava suspenze králičích erytrocytů

Králičí erytrocyty promyjte 3x v PFR+A a centrifugujte 10 min. při 1000g. Po poslední centrifugaci připravte ze sedimentovaných erytrocytů 1% suspenzi v PFR+A.

3. Příprava redukovaného streptolysinu O (SLO)

Do lahviček se SLO a Redukčním činidlem dejte po 1 ml PFR+A (nejlépe injekční stříkačkou přes gumovou zátku, abyste zamezili ztrátám lyofilizovaného materiálu). Po dokonalém rozpuštění přeneste kvantitativně obsahy obou lahviček do 9 ml PFR+A. Takto připravený roztok SLO obsahuje 1 m.j./0,5ml.

Roztok spotřebujte tentýž den.

4. Ředění séra

Ve zkumavkách připravte dvě základní ředění vyšetřovaného, inaktivovaného (56°C po dobu 30 min. \pm 1min.) séra:

- a) 1:25 (50 μ l séra + 1,2 ml PFR+A)
- b) 1:30 (0,5 ml séra ředěného 1:25 + 0,1 ml PFR+A)

5. Příprava mikrotitrační destičky (typ U) a vlastní provedení testu

Sérum titrujte ve vodorovné řadě mikrotitrační destičky. U každého vyšetřovaného séra dejte do prvních dvou jamek po 50 μ l PFR+A. Do zbylých 10 jamek dejte po 25 μ l PFR+A.

Do **první** jamky přeneste 50 μ l séra ředěného 1:25 a po důkladném promíchání přeneste pomocí mikropipety 50 μ l do **třetí** jamky. Stejným způsobem pokračujte v ředění séra ve všech **lichých** jamkách až do jedenácté jamky. 50 μ l naředěného séra z 11. jamky odstraňte.

Do **druhé** jamky přeneste 50 μ l séra ředěného 1:30 a po důkladném promíchání přeneste pomocí mikropipety 50 μ l do **čtvrté** jamky. Stejným způsobem pokračujte v ředění séra ve všech **sudých** jamkách až do dvanácté jamky. 50 μ l séra z 12. jamky odstraňte.

K takto naředěnému séru přidejte do 1. a 2. jamky po 50 μ l PFR+A a do všech ostatních jamek přidejte po 25 μ l PFR+A a důkladně promíchejte (na třepače nebo poklepem na stěny destičky). Z 1. a 2. jamky odstraňte po 50 μ l naředěného séra. V každé jamce je potom konečný objem naředěného séra 50 μ l.

Do každé jamky s naředěným sérem přidejte 25 μ l redukovaného roztoku SLO. Po důkladném promíchání inkubujte ve vlhké komoře v termostatu 15 min \pm 1min. při 37°C \pm 1°C. Po inkubaci přidejte do všech jamek po 25 μ l 1% suspenze králičích erytrocytů (před každým použitím suspenzi dobře promíchejte). Obsah jamek řádně promíchejte (poklepem na stěny destičky) a inkubujte 45 min. \pm 1 min. při 37°C \pm 1°C.



6. Odečítání výsledků

Odečtete poslední jamku bez hemolýzy (matnou): reciproká hodnota příslušného ředěného séra udává titer ASO v m.j. Pro přehled uvádíme reciproké hodnoty ředění séra (tzn. titru ASO) v jednotlivých jamkách:

Jamka č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hodnota	100	120	150	180	225	270	337	405	506	607	759	911
m.j.												

7. Kontrola

7.1. *Sérum o známém titru*

Při titraci ASO v sérech je nutná současná titrace séra o známém titru, kterým je ASO standard dodaný v soupravě. Lyofilizovaný ASO standard rozpustíte v 1 ml PFR+A (= základní ředění 1:25).

Dále postupujte tak, jak je udáno v bodech 4 b až 6. Titr takto naředěného standardu je 405 m.j. (t.j. poslední jamka bez hemolýzy je č. 8). V rámci titrační chyby se může titer ASO standardu lišit o ± 1 jamku (poslední jamka bez hemolýzy může být č. 7 - 9).

Titraci ASO standardu proveďte pouze v 10 jamkách. 11. a 12. jamku použijte na kontrolu suspenze erytrocytů a kontrolu SLO.

7.2. *Kontrola suspenze erytrocytů*

Do 11. jamky (v řadě, kde titrujete ASO standard) dejte 75 μ l PFR+A + 25 μ l 1% suspenze králičích erytrocytů. Při odečítání výsledků nesmí dojít k hemolýze.

7.3. *Kontrola SLO*

Do 12. jamky (v řadě, kde titrujete ASO standard) dejte 50 μ l PFR+A + 25 μ l SLO + 25 μ l suspenze králičích erytrocytů. Při odečítání výsledků musí dojít ke 100% hemolýze.

Hodnocení

"Normální" hodnoty ASO v séru jsou vysoce variabilní a závisí na věku vyšetřovaného, geografické oblasti, epidemiologické situaci, ročním období apod. Za horní hranici "normálních" hodnot ASO bývá obvykle pokládán titer 200 m.j. (4). Daleko spolehlivější pro průkaz předchozí streptokokové infekce je zjištění signifikantního vzestupu titru ASO v séru pacienta. U doporučené metody je to rozdíl mezi titrací dvou vzorků sér větší než jedna jamka. Vzestup ASO po streptokokové infekci obvykle dosahuje maxima mezi 3. a 5. týdnem po jejím začátku. Proto se doporučuje titrace nejméně 2 vzorků sér, odebraných s určitým časovým odstupem.

Po streptokokových infekcích dojde k vzestupu titru ASO zhruba v 80% případů. K zachycení většího počtu streptokokových infekcí je nutná titrace některé další streptokokové protilátky, např. antideoxyribonukleázy B.

K nespecificky zvýšenému titru ASO může také dojít v přítomnosti lipidů a lipoproteinů v séru nebo v sérech kontaminovaných.



Literatura

1. Hostetler C.L., Sawyer K.P., Nachamkin I. (1988): Comparison of three methods for detection antibodies to streptolysin O and DNase B. *J.Clin.Microbiol.* **26**, 1406.
2. Wannamaker L.W., Ayoub E.M. (1960): Antibody titres in acute rheumatic fever. *Circulation* **21**, 598.
3. Bícová R. (1997): Stanovení protilátky proti streptolysinu O mikrometodou. *Epidemiol.Microbiol.Imunol.*, **46**, č. 4, 140-144.
4. Johnson D.R., Kaplan E.L. et al. (1996): Laboratory diagnosis of group A streptococcal infections. WHO, Geneva.

Upozornění

1. Souprava ITEST ASO je dodávána v balení po 2 x 25 testech a je určena pouze pro diagnostiku *in vitro*.
2. Soupravu uchovávejte v temnu při 2 – 8°C a spotřebujte do doby expirace uvedené na štítku.
3. Při poškození primárního obalu IVD nepoužívejte a kontaktujte výrobce.
4. Nespotřebovaný IVD a prázdné obaly likvidujte v souladu se zákonem o odpadech č. 185/2001Sb. dle kategorií: 15 01 01 – papírové obaly, 15 01 02 – plastové obaly, 15 01 07 – skleněné obaly, hliník – 17 04 02, chemikálie obsahující nebezpečné látky – 18 01 06, rezidua a nespotřebovaný IVD likvidujte v kategorii 18 01 09 – jiná nepoužitelná léčiva. Odpady, na jejichž sběr a odstraňování jsou kladeny zvláštní požadavky s ohledem na prevenci infekce, likvidujte v kategorii 18 01 03.

