

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner viszeraler Amöbiose

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9550**

EC reg. N°: CH-201202-0033



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) extra-intestinaler Amöbiose mithilfe von spezifischen Antikörpern in Patienten, die sich in endemischen Gebieten aufhielten und Symptome wie Unterleibsschmerzen, Fieber und Hepatomegalie entwickeln.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Entamoeba histolytica* löslichen Trophozoiten Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9550-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Entamoeba histolytica</i> löslichen Trophozoiten Antigenen	96	Wells
DILB	9550-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9550-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9550-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9550-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9550-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9550-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9550-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9550-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9550-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9550-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9550-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenserum: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9550-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9550-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substratabletten 9550-10 im Puffer 9550-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9550-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9550-02, 9550-03, 9550-04 und 9550-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (NaN_3). Lösung 9550-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9550-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9550-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9550-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9550-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9550-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9550-10 + 9550-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 14 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9550-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Amöbiose und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9550-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Entamoeba histolytica** lösliche Trophozoite-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9550-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Entamoeba histolytica** lösliche Trophozoiten-Antigen als signifikant angesehen.

Sensitivität und Spezifität:

Eine Sensitivität von 100% wurde in Seren, einer Gruppe von 52 Patienten, mit viszeraler Amöbiose gefunden.

Eine Spezifität von 96% wurde bei einer Gruppe von 99 Blutspendern (Schweiz) gefunden.

Die Untersuchung von 71 Seren Amöbiose-Verdächtiger, aber eindeutig nicht-infizierter Patienten ergab eine Spezifität von 88,7%. Eine Spezifität von 80% ergab der Test mit 40 Seren von Patienten mit anderen parasitären Krankheiten. Die meisten Kreuzreaktionen werden durch Leishmaniose, Malaria, Filariose und Strongyloidiasis hervorgerufen.

Es ist in jedem Fall nötig, die klinischen, epidemiologischen, radiologischen und biologischen Daten zu integrieren, bevor eine endgültige Diagnose gestellt wird. Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.612	2.394	0.649	2.449
Standardabweichung (A Wert)	0.040	0.162	0.041	0.162
Variationskoeffizient (%)	6.5	6.8	6.3	6.6

Referenzen:

Nicholls, R.S., I Restrepo, M., Duque, S., Consuelo Lopez, M., Corredor, A. (1994) Standardization and evaluation of Elisa for the serodiagnostic of amoebic liver abscess. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 89: 53-58.

Visser, L.G., Verweij, J.J., Van Esbroeck, M., Edeling, W.M., Clerinx, J. Polderman A.M. (2006) Diagnostic methods for differentiation of E. histolytica and E. dispar in carriers : performance and clinical implications in a non-endemic setting. Int. journal of med. microbiol. 296 : 397-403.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

