

ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej viscerálnej amebiózy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikel č. 9550
EC reg. zn.: CH-201202-0033



Plánované použitie:

Sérologická diagnóza (IgG) extraintestinálnej amebiózy detekovaním špecifických protilátok u cestovateľov vracajúcich sa z endemických oblastí a so symptómami ako bolesť brucha, horúčka a hepatomegália. Post-terapeutické kontroly.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitizedých rozpustnými trofozoitnými antigénmi *Entamoeba histolytica*. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalickéj fosfatázy. Senzitizedé platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9550-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedé rozpustnými trofozoitnými antigénmi <i>Entamoeba histolytica</i>	96	jamky
DILB	9550-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9550-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9550-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9550-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9550-09	Proteín A – konjugát alkalickéj fosfatázy	300	µl
SUBS	9550-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μl). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9550-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitivované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9550-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9550-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μl kontrolných sér 9550-06 až -08 v 190 μl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μl séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9550-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9550-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9550-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9550-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9550-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9550-02, 9550-03, 9550-04 a 9550-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3N_3). Roztok 9550-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9550-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9550-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9550-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9550-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9550-09 + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9550-06 až -08 + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrášením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 14 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9550-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov amebiózy a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9550-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti rozpustným antigénom **Entamoeba histolytica** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9550-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti rozpustným antigénom **Entamoeba histolytica** považovaná za klinicky významnú.

Citlivosť a presnosť testu:

Diagnostická citlivosť vo výške 100% bola spozorovaná pri 52 sérach pacientov trpiacich na viscerálnu amebiózu.

Presnosť vo výške 96% bola spozorovaná pri 99 sérach od švajčiarskych darcov krvi.

Presnosť vo výške 88,7% bola spozorovaná pri 71 sérach pacientov podozrivých na amebiózu, ale pri ktorých bola táto choroba definitívne vylúčená.

Presnosť vo výške 80% bola spozorovaná pri 40 sérach pacientov trpiacich inými parazitárnymi ochoreniami. Väčšina skrížených reakcií je spôsobená liehmaniózou, maláriou, filariózou a strongyloidózou.

Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

V každom prípade je nutné zlúčiť všetky klinické, epidemiologické, rádiologické a biologické údaje pred ustanovením finálnej diagnózy.

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.612	2.394	0.649	2.449
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.040	0.162	0.041	0.162
Variačný koeficient (%)	6.5	6.8	6.3	6.6

Odkazy na použitú literatúru:

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

