

# ENTAMOEBEA HISTOLYTICA

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej viscerálnej amebiózy na *E. histolytica*

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie

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



## Plánované použitie:

Súprava Bordier Entamoeba histolytica ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Entamoeba histolytica* v ľudskom. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

## Pozadie:

Amebiáza je spôsobená prvokom *Entamoeba histolytica*, patogénna améba. Ľudia môžu byť infikovaní náhodným požitím amoebných cystov v kontaminovaných potravinách alebo vode. Najčastejšie sa vyskytujú symptómy počas štádia čriev (bolesť žalúdka a hnačka). Avšak v niektorých prípadoch sa parazit stane extra-intestinálne invazívny, a tak vedie k tvorbe abscesu hlavne v pečeni. Pacienti trpia hlavne horúčkou a bolesťou brucha. Diagnóza extra-intestinálnej amebiázy je založená na zobrazovacích technikách, ako sú CT skenovanie, ultrasonografia a MRI na zistenie pečenej lézie a pozitívny výsledok sérologickým testovaním. Sérologia sa tiež používa na vylúčenie amebiázy v rámci diferenciálnej diagnostiky s ďalšími ochoreniami pečene.

## Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitivovaných rozpustnými trofozoitnými antigénmi *Entamoeba histolytica*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalického fosfatázy. Druhý premývací krok odstráni nenašpecifický konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalického fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Entamoeba histolytica* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodoštičiek ELISA.

Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

## Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

<b>WELL</b>	9550-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi rozpustnými trofozoitnými <i>Entamoeba histolytica</i>	96	jamky
<b>DILB</b>	9550-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
<b>WASH</b>	9550-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9550-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9550-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9550-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9550-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9550-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
<b>CONJ</b>	9550-09	Proteín A - konjugát alkalického fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
<b>SUBS</b>	9550-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		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), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

### Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

### Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

**Jamky ELISA:** otvorte hliníkovú tašku 9550-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitizedované 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. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

**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 alkalické fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Kontrolné séra:** rozriedte 10 µl kontrolných sér 9550-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Konjugát:** rozriedte konjugát 9550-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

**Roztok substrátu:** rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9550-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9550-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

**Zastavovací roztok:** použite reagent 9550-05, nezriedený.

### Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladujte pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

### Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9550-02	0.1 %	0.02 %
Premývací roztok (10 x)	9550-03	0.05 %	/
Premývací roztok	9550-04	0.01 %	/
Kontrolné séra (20 x)	9550-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Konjugát (50 x)	9550-09	0.1 %	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- 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.
- Zaobchádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.

### **Pokyny pre likvidáciu:**

---

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

### **Postup:**

---

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

#### **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 vytrasením prúžkov nad umývadlom.

#### **Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:**

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100  $\mu$ l tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100  $\mu$ l zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100  $\mu$ l každá).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250  $\mu$ l premývacieho roztoku.

#### **Krok 3: Inkubácia s konjugátom:**

Rozdeľte 100  $\mu$ l zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250  $\mu$ l premývacieho roztoku.

#### **Krok 4: Inkubácia so substrátom:**

Rozdeľte 100  $\mu$ l roztoku substrátu do každej jamky.

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

Inhibujte reakciu pridaním 100  $\mu$ l zastavovacieho roztoku do každej jamky.

#### **Krok 5: Meranie absorbancie:**

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

### **Vyhodnotenie:**

---

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 14 % A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

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. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom rozpustnými trofozoitnými *Entamoeba histolytica* klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom rozpustnými trofozoitnými *Entamoeba histolytica* považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

#### Citlivosť a presnosť:

Bola zistená citlivosť 100% v 52 sérach pacientov trpiacich viscerálnou amebiózou. Presnosť s výškou 96% sa vyskytla pri 99 sérach darcov krvi (švajčiarskych). Presnosť vo výške 96% bola spozorovaná pri 99 sérach od švajčiarskych darcov krvi. Presnosť vo výške 89% bola spozorovaná pri 71 sérach pacientov podozrivých na amebiázu, ale pri ktorých bola táto choroba definitívne vylúčená.

#### Interferencie:

Vnútorne hodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické alebo ikterické séra neinterferujú s výsledkami testu.

#### Precíznosť:

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
<b>Priemer (absorbancia)</b>	0.612	2.394	0.649	2.449
<b>Štandardná odchýlka (absorbancia)</b>	0.040	0.162	0.041	0.162
<b>Variačný koeficient (%)</b>	6.5	6.8	6.3	6.6

#### Obmedzenia:

Zistila sa presnosť 80% u 40 sér pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa vyskytuje hlavne u pacientov s leishmaniózou, maláriou, filariózou a silyloididázou.

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

#### Odkazy na použitú literatúru:

Nicholls, R.S., 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

