

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus išorinei žarnyno amebiozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9550

EC reg. N°: CH-201202-0033

Naudojimo paskirtis:

Serologinei išorinės žarnyno amebiozės diagnozei (IgG), nustatant specifinius antikūnus keliautojams, po jų grįžimo iš endeminių zonų ir pastebėjusiems simptomus, tokius kaip pilvo skausmas, karščiavimas ir hepatomegalija. Poterapinei kontrolei.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Entamoeba histolytica* tirpiaisiais antigenais, atlikimui. Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9550-01	Laužomos ELISA juostelės su <i>Entamoeba histolytica</i> tirpiaisiais antigenais	96	šulinėliai
DILB	9550-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
WASH	9550-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9550-05	Stabdomasis tirpalas (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONTROL -/+	9550-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	μl
CONTROL +	9550-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	μl
CONJ	9550-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	μl
SUBS	9550-10	Fosfatazės substratas	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis – ELISA 8-šulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°- 8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

ELISA šulinėliai: atidaryti folinio maišelio 9550-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9550-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9550-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9550-06 – 9550-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

Tiriamas serumas: praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 9550-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9550-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9550-10 nepraskiestame buferyje 9550-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9550-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9550-02, 9550-03, 9550-04 ir 9550-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_3Na). Tirpalas 9550-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9550-05 (0,5 M K_3PO_4) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9550-06 – 9550-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Skiedimo buferis (10 x)	9550-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Plovimo tirpalas (10 x)	9550-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugatas	9550-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolinis serumas	9550-06 to -08 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Tiriamas serumas	Serumas + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrato tirpalas	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedūra:

1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

Įpilti 100 μ l skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės šulinėlį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 μ l praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 μ l kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 μ l).

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 μ l praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 μ l substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 μ l stabdomojo tirpalo.

5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 14% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9550-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo amebiozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9550-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš *Entamoeba histolytica* tirpiasis antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9550-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš *Entamoeba histolytica* tirpiasis antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

100% testo jautrumas buvo suskaičiuotas testuojant 52 pacientų, kenčiančių nuo visceralinės amebiozės, serumus.

96% specifiškumas nustatytas testuojant 99 šveicarų kraujo donorų serumus.

88,7% specifiškumas nustatytas su 71 pacientų, kuriems buvo įtariama amebiazė (ši liga buvo visiškai atmesta), serumu.

80% specifiškumas yra nustatytas testuojant 40 serumų pacientų, kenčiančių nuo kitų parazitinių ligų. Dauguma kryžminių reakcijų gali būti sukeltos leišmaniazės, maliarijos, filariazės ir strongiloidiazės. Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Bet kuriuo atveju būtina integruoti visus klinikinius, epidemiologinius, radiologinius ir biologinius duomenis prieš nustatant diagnozę.

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius 24 šulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	0.612	2.394	0.649	2.449
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0.040	0.162	0.041	0.162
Pokyčio koeficientas (%)	6.5	6.8	6.3	6.6

Literatūros šaltiniai:

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

