

# ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af visceral amebiasis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9550  
EC reg. N°: CH-201202-0033



## Tilsligtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af ekstraintestinal amebiasis ved detektering af specifikke antistoffer i rejsende, som vender tilbage fra endemiske områder, og som udvikler symptomer som mavepine, feber og hepatomegali. Post-terapeutiske kontroller.

## Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyser (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Entamoeba histolytica* opløselige trophozoit antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

## Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

<b>WELL</b>	9550-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Entamoeba histolytica</i> opløselige antigener	96	brønde
<b>DILB</b>	9550-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
<b>WASH</b>	9550-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9550-04	Enzym buffer	50	ml
<b>STOP</b>	9550-05	Stopløsning (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9550-06	Negativt kontrolserum	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9550-07	Svagt positivt serum (afskåret)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9550-08	Positivt kontrolserum	200	µl
<b>CONJ</b>	9550-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
<b>SUBS</b>	9550-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

## Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

## Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and  $\mu\text{l}$ ). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

## Klargøring af reagens inden anvendelse:

**Elisa brønde:** åbn siden af aluminiumstasken 9550-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

**Fortyndingsbuffer:** fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9550-02, 1/10 i destilleret vand.

**Vaskeløsning:** fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9550-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10  $\mu\text{l}$  kontrolsera 9550-06 til -08 i 190  $\mu\text{l}$  fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

**Sera, som skal testes:** fortynd 10  $\mu\text{l}$  serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9550-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

**Substratløsning:** forvarm enzymbuffer 9550-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9550-10 i ufortyndet buffer 9550-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

**Stopløsning:** anvend reagens 9550-05 ufortyndet.



**Advarsler og sikkerhedshensyn:** Løsninger 9550-02, 9550-03, 9550-04 og 9550-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid ( $\text{N}_3\text{Na}$ ). Løsning 9550-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9550-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9550-06 til 8) er fra kaniner.

## Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9550-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9550-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9550-09 + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9550-06 til -8 + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## **Procedure:**

### **Trin 1: Blokering:**

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

### **Trin 2: Inkubation med serumprøver:**

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 3: Inkubation med konjugat:**

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 4: Inkubation med substrat:**

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

### **Trin 5: Måling af absorbanser:**

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

## Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 14% af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9550-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af amebiasis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9550-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Entamoeba histolytica** opløselige antigener klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er positivt, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af det svagt positive serum 9550-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Entamoeba histolytica** opløselige antigener for at være klinisk signifikant.

## Analysens sensitivitet og specificitet:

Sensitiviteten af testen var beregnet på 100% med 52 sera fra patienter, som lider af visceral amoebiasis.

En specificitet på 96% er observeret med 99 sera fra schweiziske bloddonorer.

En specificitet på 88,7% er observeret med 71 sera fra amebiasis mistænkte patienter, men hvor denne sygdom med sikkerhed er udelukket.

En specificitet på 80% er observeret med 40 sera fra patienter, som lider af andre parasitsygdomme. De fleste krydsreaktioner er forårsaget af leishmaniasis, malaria, filariasis og strongyloidiasis.

Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultateterne af testen.

I alle tilfælde er det nødvendigt at integrere alle de kliniske, epidemiologiske, radiologiske og biologiske data, før den endelige diagnose stilles.

Reperterbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Reperterbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (OD værdi)	0,612	2,394	0,649	2,449
Standardafvigelse (OD værdi)	0,040	0,162	0,041	0,162
Variationskoefficient (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

## Referencer:

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

