

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos visceral amebiasis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9550

EC reg. N°: CH-201202-0033



Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) av extra-intestinal amebiasis genom att upptäcka specifika antikroppar i resenärer som återvänder från endemiska områden och utvecklar symptom som buksmärter, feber och hepatomegaly. Post terapeutiska kontroller.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Entamoeba histolytica* lösliga trophozoite antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 provningar):

WELL	9650-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Entamoeba histolytica</i> lösliga antigener	96	brunnar
DILB	9550-02	Utspännings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9550-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9550-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9550-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9550-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9550-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9550-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9550-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9550-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9550-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 9550-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9550-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9550-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9550-10 i utspädd buffert. 9550-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tabletten.

Stopplösning: använd reagens 9550-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9550-02, 9550-03, 9550-04 och 9550-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9550-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9550-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9550-06 till -08) är från kaniner.

Volymer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9550-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9550-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9550-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9550-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 14 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9550-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av amebiasis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9550-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Entamoeba histolytica* lösliga antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9550-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Entamoeba histolytica* lösliga antigener anses vara kliniskt signifikant.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

Känsligheten av testet var beräknad på 100 % med 52 sera från patienter lidande av visceral amoebiasis.

En specificitet av **96 %** är observerad med 99 sera från Swiss bloddonörer.

En specificitet av 88.7 % är observerad med 71 sera från amebiasis misstänkta patienter, men där denna sjukdom har säkert uteslutas.

En specificitet av **80 %** är observerad med 40 sera från patienter lidande från andra parasitsjukdomar. De flesta av de korsreaktionerna orsakas av leishmaniasis, malaria, filariosis och strongyloidiasis. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

I vilket fall som helst är det nödvändigt att integrera alla kliniska, epidemiologiska, radiologiska och biologiska data innan upprättandet av den slutliga diagnosen.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (OD värde)	0.612	2.394	0.649	2.449
Standardavvikelse (OD värde)	0.040	0.162	0.041	0.162
Variationskoefficient (%)	6.5	6.8	6.3	6.6

Referenser:

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

