

ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu viscerální amebiázy

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. **9550**
Reg. č. ES: CH-201202-0033



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) extraintestinální amebiázy pomocí detekce specifických protilátek u cestovatelů vracejících se z endemických oblastí s rozvíjejícími se symptomy jako bolest břicha, horečka a hepatomegalie. Post terapeutické kontroly.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících rozpustné trofozoitní antigeny *Entamoeba histolytica*. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9550-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rozpustné antigeny <i>Entamoeba histolytica</i>	96	destiček
DILB	9550-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9550-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9550-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9550-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9550-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9550-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9550-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9550-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: **zřed'te koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9550-02 v destilované vodě v poměru 1/10.**

Vyplachovací roztok: zřed'te koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9550-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zřed'te 10 μ l kontrolního séra 9550-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zřed'te 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zřed'te konjugát 9550-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9550-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpust'te tablety substrátu fosfatázy 9550-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9550-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9550-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9550-02, 9550-03, 9550-04 a 9550-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 9550-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9550-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9550-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9550-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9550-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9550-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9550-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 14% A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9550-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů amébiázy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9550-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Entamoeba histolytica* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9550-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Entamoeba histolytica* považována za klinicky významnou.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost testu byla vypočtena na 100 % u 52 sér od pacientů trpících viscerální amébiázou.

Specifita 96 % je pozorována u 99 sér od švýcarských dárců krve.

Specifita 88,7 % je pozorována u 71 sér od pacientům s podezřením na amébiázu, kde bylo toto onemocnění s jistotou vyloučeno.

Specifita 80 % je pozorována u 40 sér od pacientů trpících jinými parazitickými onemocněními. Většina příčných reakcí je způsobena leishmaniózou, malárií, filariózou a strongyloidózou.

Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu. V každém případě je nutné integrovat všechny klinické, epidemiologické, radiologické a biologické údaje před stanovením konečné diagnózy.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (hodnota OD)	0,612	2,394	0,649	2,449
Standardní odchylka (hodnota OD)	0,040	0,162	0,041	0,162
Koeficient odchylky (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Reference:

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.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ct

