

# Entamoeba histolytica IgG ELISA

Imunološko određivanje enzimima za dijagnozu ljudske invazivne amebijaze

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Upute za upotrebu za br. artikla **9550**  
Reg. Br. EZ-a: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



## Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA namijenjen je za kvantitativno prepoznavanje antitijela protiv *Entamoeba histolytica* u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda.

## Pozadina:

Amebijazu uzrokuje praživotinja *Entamoeba histolytica*, patogena ameba. Ljudi se mogu zaraziti slučajnom konzumacijom amebskih *cista* iz kontaminirane hrane ili vode. Najčešći simptomi pojavljuju se tijekom crijevne faze (bolovi u želucu i proljev). Međutim, u pojedinim će slučajevima parazit postati posebno crijevno invazivan i tako dovesti do stvaranja apscesa, poglavito na jetrima. Bolesnici će uglavnom bolovati od vrućice i bolova od truhu. Dijagnoza akutne crijevne amebijaze temelji se na metodama snimanja kao što su CT snimke, ultrazvuk i MR snimke za identifikaciju lezije jetara uz pozitivan rezultat dobiven serološkim testiranjem. Serologija se upotrebljava i za isključivanje amebijaze u okviru diferencijalne dijagnoze s drugim bolestima jetara.

## Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranim *Entamoeba histolytica* topljivim trofozoitnim antigenima. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Entamoeba histolytica* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test se može provesti automatskim sustavima, no to mora potvrditi korisnik.

## Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

<b>WELL</b>	9550-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Entamoeba histolytica</i> topljivi antigeni trofozoita	96	jažica
<b>DILB</b>	9550-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
<b>WASH</b>	9550-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9550-04	Enzimski pufer	50	ml
<b>STOP</b>	9550-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9550-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9550-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9550-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
<b>CONJ</b>	9550-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
<b>SUBS</b>	9550-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

## Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet na temperaturi od 2 °C do 8 °C (transportirajte na okolnoj temperaturi), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i LOT broj kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi od 2°C do 8°C.

## Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na 37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

## Priprema reagensa prije upotrebe:

Osigurajte da svi reagensi budu na sobnoj temperaturi i pomiješajte ih prije upotrebe.

**Jažice ELISA:** otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9550-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

**Pufer za razrjeđivanje:** razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9550-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

**Otopina za ispiranje:** razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9550-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

**Kontrolni serumi:** razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9550-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

**Konjugat:** razrijedite konjugat 9550-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

**Otopina supstrata:** otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9550-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9550-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

**Otopina za zaustavljanje:** upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9550-05.

## Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum se treba čuvati na temperaturi od 2°C do 8°C ako će se analizirati unutar nekoliko dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje. Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml).

## Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9550-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	9550-03	0,05%	/
Enzimski pufer	9550-04	0,01%	/
Kontrolni serumi (20 x)	9550-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9550-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

- Otopina za zaustavljanje 9550-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ima nadražujuć učinak.
- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9550-06 do -08) potječu od kunića.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense ni različite LOT brojeve kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.
- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

## Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

### 1. korak: Blokiranje:

U cijelosti napunite jažice otopinom pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 – 15 minuta na sobnoj temperaturi (blokiranje).

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

### 2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

### 3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

### 4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

### 5. korak: Mjerenje apsorcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

## Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 12% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 12% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

Kontrole kvalitete trenutačnih LOT brojeva objavljene su na našem web-mjestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9550-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva invazivne amebijaze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **1,0**. U ovom je slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Entamoeba histolytica* klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka viši od **1,0**. U ovom se slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Entamoeba histolytica* smatra klinički značajnom. To označava da je bolesnik bio u dodiru s parazitom.

Svaki laboratorij može definirati sivu zonu u skladu sa svojom bolesničkom populacijom. U slučaju graničnih ili sumnjivih rezultata preporučujemo ponavljanje testa nakon 2 - 4 tjedna upotrebom svježeg uzorka.

U slučaju sumnjiva rezultata preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

## Analitički rezultati:

### Analitička specifičnost:

Specifičnost od 80 % pronađena je u 40 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija. Unakrižna reaktivnost poglavito nastupa u bolesnika s lišmeniozom, malarijom, filarijazom i strongiloidozom.

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

### Preciznost:

Ponovljivost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 10 različitih testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjek (apsorpcija)	0,612	2,394	0,649	2,449
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,040	0,162	0,041	0,162
Koeficijent varijacije (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Sljedeći rezultati ne mogu se procijeniti jer ne postoji potvrđeni referentni materijal za tu analizu:

- analitička osjetljivost (ograničenja prepoznavanja i kvantizacije)
- točnost
- istinitost
- mjerni raspon
- linearnost.

## Klinički rezultati:

### Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 100 % pronađena je u 52 seruma od bolesnika koji boluju od invazivne amebijaze.

### Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 96 % pronađena je u 99 seruma (švicarskih) darivatelja krvi. Specifičnost od 89 % pronađena je u 71 serumu bolesnika kod kojih se sumnja na amebijazu, no kod kojih je postojanje ove bolesti sa sigurnošću isključeno.

### Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 81% i NPV od 100% pronađene su u spomenutim populacijama.

### Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 71 seruma od bolesnika kod kojih se sumnja na amebijazu, no kod kojih je postojanje ove bolesti sa sigurnošću isključeno, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,57. U pogođenoj populaciji od 52 seruma od bolesnika koji boluju od invazivne amebijaze, očekivana indeksna vrijednost iznosi 5,43.

### Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

### Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

### 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, Švicarska.

Telefon: + 41 21 633 31 67, telefaks: + 41 21 633 31 78, [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

