

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human invasiv amøbiasis

96 analyser på særskilte brønde til in vitro diagnostisk brug og til professionel laboratoriebrug



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9550
N.º reg. CE: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Tilsigtet anvendelse:

Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA kit er beregnet til kvantitativ påvisning af IgG antistoffer mod *Entamoeba histolytica* i humant serum. Serologi er en hjælp til diagnose og kan ikke bruges som eneste diagnosemetode.

Baggrund:

Amebiasis er forårsaget af den protozoanske *Entamoeba histolytica*, en patogen amoeba. Mennesker kan inficeres ved at indtage amoebesystemer i forurenede mad eller vand. De hyppigste symptomer vises under tarmstadiet (mavepine og diarré). Imidlertid vil parasitten i nogle tilfælde blive ekstraintestinalt invasiv og dermed føre til abscessdannelse hovedsagelig i leveren. Patienterne lider hovedsageligt af feber og mavesmerter. Diagnose af ekstern intestinal amebiasis er baseret på billedbehandlingsteknikker, såsom CT-scanninger, ultralyd og MR til at detektere leverlæsion og et positivt resultat ved serologisk testning. Serologi bruges også til at udelukke amebiasis inden for rammerne af differentiell diagnose med andre leversygdomme.

Princip og præsentation

Kittet giver alt det materiale som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA), på skrøbelige mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Entamoeba histolytica* opløselige trofozoit antigener. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Afsløring af bundne antistoffer vil ske ved tilsætning af pNPP substrat, som bliver gul i nærvær af alkalisk fosfatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Entamoeba histolytica*-specifikke antistoffer i prøven. Kaliumphosphat tilsættes for at stoppe reaktionen. Absorbans ved 405 nm læses ved anvendelse af en ELISA mikropode læser.

Prøven kan udføres med automatiske systemer, men dette skal valideres af brugeren.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9550-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Entamoeba histolytica</i> opløselige trofozoit antigener	96	brønde
DILB	9550-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml
WASH	9550-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9550-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9550-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL +	9550-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ	9550-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl
SUBS	9550-10	Fosfatase-substrat (Para-nitrophenylphosphat)	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), undgå langsigtet eksponering af komponenterne i direkte lys. Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen. Efter første åbning er alle reagenser stabile indtil udløbsdatoen, dette er om de opbevares ved 2-8°C.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and µl). 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. Manuel eller automatisk udstyr til skylning af brønde. Vortex mixer. Timer.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Hold alle reagenser i stuetemperatur og bland dem inden brug.

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9550-01, og tag det nødvendige antal brønde. (en for blankt, tre for kontroller plus antal prøver). 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 tørrepudd.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9550-02, 1/10 i destilleret vand. Dette anvendes til fortynding af kontroller, prøver og konjugater. Den fortyndede buffer er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

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. Den fortyndede vaskeopløsning er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Kontrolsera: fortynd 10 µl kontrolsera 9550-06 til -08 i 190 µl fortyndingsbufferopløsning (endelig fortynding 1/20). Den fortyndede kontrolsera er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Konjugat: fortyndet konjugat 9550-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9550-10 i ufortyndet enzym buffer 9550-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst. Fortynd substratet på analysedagen og beskyt røret fra direkte lys. Tabletter og substratopløsninger bør være farveløse eller bør kun have en lille gul tinge. Hvis en tablet eller en substratopløsning bliver gul, kan den have været delvis hydrolyseret og bør kasseres. Opbevar ikke substratopløsningen.

Stopløsning: anvend reagens 9550-05 ufortyndet.

Prøveudtagning og forberedelse:

Brug humant serum. Hvis analyseres inden for få dage skal serum skal opbevares ved 2-8°C, ellers opbevares ved -20°C eller lavere. Undgå at gentage frysning og optøning. Vortex prøver og fortynd 1/201 i fortyndingsbufferopløsning (fx 5 µl prøve i 1,0 ml).

Advarsler og sikkerhedshensyn:

Giftige stoffer findes i følgende koncentration:

Komponent	Reference	Natriumazid (NaN ₃)	Merthiolat
Fortyndingsbuffer (10 x)	9550-02	0,1%	0,02%
Vaskeopløsning (10 x)	9550-03	0,05%	/
Enzymbuffer	9550-04	0,01%	/
Kontrolsera (20 x)	9550-06 til -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9550-09	0,1%	/

Ved de anvendte koncentrationer har natriumazid og merthiolat ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinder.

- Stopløsning 9550-05 (0,5 M K₃PO₄) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9550-06 til -08) er fra kaniner.
- Behandle alle reagenser og prøver som potentielt infektiøst materiale.
- Byt ikke reagenser fra forskellige partier eller Bordier ELISA kits.
- Brug ikke reagenser fra andre producenter med reagenser i dette kit.
- Brug ikke reagenser efter deres udløbsdatoe.
- Luk reagensflasker tæt straks efter brug, og udskift ikke skruehætter for at undgå forurening.
- Brug separate og rene pipetter tips til hver prøve.
- Mikrobrønde må ikke genbruges.
- Undgå forringelse af mikrobrønde ved mekanisk påvirkning (spidser/kegler, dyser).
- Beskrivelser af de anvendte symboler på etiketterne kan findes på hjemmesiden www.bordier.ch.

Vedrørende Bortskaffelse:

Alle materialer, der bliver anvendt i denne test, betragtes generelt som farligt affald. Henvi til nationale og regionale love og bestemmelser for bortskaffelse af farligt affald.

Procedure:

Når du kører analysen, undgå at der dannes bobler i brøndene.

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 prøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (ikke-serumblank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med henholdsvis 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrol serum. Til analyser med mere end 25 prøver anbefaler vi at fylde de tre sidste brønde med kontrol sera som et duplikat.

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera prøver (100 µl hver).

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

Fjern sera, og vask 4 x ~ 250 µl med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet konjugat i hver brønd. (inklusive ikke-serumblank).

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

Fjern konjugat, og vask 4 x med ~ 250 µl 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:

Hvis det er nødvendigt, tør bunden af brøndene af, og fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm. inden for 1 time efter tilsætning af stopopløsning.

Fortolkning:

Træk værdien af ikke-serumblank fra alle målte værdier. Når det er relevant, beregnes de gennemsnitlige absorbansværdier for duplikeret serumkontrol. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt:

- Absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200
- A med svag positiv kontrol > 12% af A med positiv kontrol
- A af negativ kontrol < 12% af A af positiv kontrol
- A af ikke-serumblank < 0,350

Kvalitetskontrol af aktuelle partier offentliggøres på vores hjemmeside: www.bordier.ch.

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

Afsnitets afskårne indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serumblank som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{absorbans prøve}}{\text{Absorbans afskåret serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når Indeks af den analyserede prøve er lavere end **1,0**. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod *Entamoeba histolytica* antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når Indeks af den analyserede prøve er højere end **1,0**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod *Entamoeba histolytica* antigener at være klinisk signifikant. Det indikerer, at patienten har haft kontakt med parasitten.

En grå zone kan defineres af hvert laboratorium i overensstemmelse med dets patientpopulation. I tilfælde af grænseoverskridende eller tvivlsomme resultater anbefaler vi at gentage testen igen 2-4 uger senere med en frisk prøve.

I tilfælde af et positivt eller tvivlsomt resultat, anbefaler vi at udføre en bekræftelsestest (oftest med western blotting), hvis en sådan test er tilgængelig eller kræves i henhold til nationale bestemmelser.

Analytisk ydeevne:

Analytisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 80 % hos 40 sera fra patienter med andre parasitære infektioner. Krydsreaktivitet forekommer hovedsageligt hos patienter med leishmaniose, malaria, filarioser og strongyloidose.

Der blev ikke observeret nogen positiv eller negativ interferens med suprafysiologiske koncentrationer af hæmoglobin, lipider eller bilirubin i sera suppleret med interferenter.

Præcision:

Repeterbarhed 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.

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

Følgende præstationer kan ikke evalueres, fordi der ikke er noget certificeret referencemateriale til denne analyse:

- Analytisk følsomhed (detektions- og kvantificeringsgrænser)
- Nøjagtighed
- Rigtighed
- Måleområde
- Linearitet

Kliniske præstationer:

Diagnostisk følsomhed:

En følsomhed på 100 % med 52 sera fra patienter, der lider af invasiv amøbiasis.

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 96 % blev fundet med 99 sera fra bloddonorer (schweiziske). En specificitet på 89 % blev fundet med 71 sera fra patienter med mistænkt amøbiasis, men hvor denne sygdom helt sikkert er blevet udelukket.

Positiv og negativ prædiktiv værdi:

Der blev fundet en PPV på 81% og en NPV på 100% hos de ovenfor nævnte populationer.

Forventede værdier i normale og berørte populationer:

I en normal population på 71 sera fra patienter med mistænkt amebiasis, men hvor denne sygdom helt sikkert er udelukket, er den forventede indekssværdi 0,57. I en påvirket population på 52 sera fra patienter, der lider af invasiv amøbiasis, er den forventede indekssværdi 5,43.

Hændelser:

Enhver alvorlig hændelse, der indtræffer i forbindelse med udstyret, skal meddeles fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

Begrænsninger:

Diagnose af en smitsom sygdom bør ikke udarbejdes på basis af et enkelt testresultat. En præcis diagnose bør tage hensyn til endemisk situation, klinisk historie, symptomatologi, billeddannelse samt serologiske data. Hos immunkompromitterede patienter og nyfødte er serologiske data af begrænset værdi.

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

