

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för diagnos av mänskliga inkräktande amebiasis

96 analyser på enskilda brunnar för in vitro diagnostisk användning och för professionell laboratorieanvändning



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Instruktioner för användning av artikel N° 9550
N° reg. CE: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Avsedd användning:

Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA kitet är avsedd för kvantitativ upptäckt av IgG antikroppar mot *Entamoeba histolytica* i mänskligt serum. Sereologi är ett hjälpmedel mot diagnoser och kan användas som ensam metod för diagnos.

Bakgrund:

Amöbainfektion orsakas av protozoan *Entamoeba histolytica*, en patogen amöba. Människor kan smittas av oavsiktligt intag av amöbiska cystor i förorenad mat eller vatten. De vanligaste symptomen uppträder under tarmstadiet (magont och diarré). I vissa fall kommer parasiten att bli extraintestinalt invasiv och leder sålunda till abscessbildning huvudsakligen i levern. Patienterna kommer huvudsakligen att drabbas av feber och buksmärter. Diagnos av extra intestinal amebiasis är baserad på bildteknik, såsom CT-skanningar, ultraljud och MR för att detektera leverskador och ett positivt resultat genom serologisk testning. Serologi används också för att exkludera amöbainfektionen inom ramen för differentialdiagnos med andra leversjukdomar.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på ömtåliga mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Entamoeba histolytica* lösliga trophozoite antigener. Specifika antikroppar i testet kommer att binda dessa antigener och tvättning kommer ta bort ospecifika antikroppar. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Ett andra tvättsteg kommer att avlägsna obundet konjugat. Återgivning av bundna antikroppar görs genom tillsats av pNPP-substrat som blir gult i närvaro av alkaliskt fosfatas. Färgintensiteten är proportionell mot mängden av *Entamoeba histolytica* specifika antikroppar i provet. Kaliumfosfat tillsättes för att stoppa reaktionen. Absorbans vid 405 nm läses med användning av en ELISA-mikroplatta läsare.

Testet kan utföras med automatiska system, men detta måste valideras av användaren.

Material som ingår i kitet (96 provningar):

| | | | | |
|--------------------|---------|--|-----|-----------|
| WELL | 9550-01 | Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Entamoeba histolytica</i> lösliga trophozoite antigener | 96 | brunnar |
| DILB | 9550-02 | Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila | 50 | ml |
| WASH | 9550-03 | Tvättlösning (10 x) koncentrat | 50 | ml |
| ENZB | 9550-04 | Enzybuffert | 50 | ml |
| STOP | 9550-05 | Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9550-06 | Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 9550-07 | Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock | 200 | µl |
| CONTROL + | 9550-08 | Positivt kontrollserum (20 x), rött lock | 200 | µl |
| CONJ | 9550-09 | Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock | 300 | µl |
| SUBS | 9550-10 | Fosfatas substrat (para-nitrofenylfosfat) | 20 | tabletter |
| | | Multipipett reservoar, 25 ml | 1 | styck |
| | | Ram för ELISA 8-brunnhållare | 1 | styck |

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8°C (transportera vid omgivningstemperatur). Undvik långvarig exponering av komponenterna för direkt ljus. Utgångsdatumet och partinumret av kitet anges på sidan av lådan. Efter första öppningen är alla reagens stabila till och med utgångsdatumet när de lagras vid 2-8°C.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för spädnings av sera. Limtejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37°C. ELISA läsare inställd på 405 Nm. Manuell eller automatisk utrustning för sköljning av brunnar. Vortex-blandare. Timer.

Preparationer av reagens innan användning:

Få alla reagens till rumstemperatur och blanda före användning.

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9550-01 och ta bort antal brunnar som behövs (en för blank, tre för kontroller, plus antal prov). 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.

Spädningsbuffert: utspädd spädningsbuffert (10 x) koncentrat 9550-02, 1/10 i destillerat vatten. Detta används för utspädning av kontroller, prover och konjugat. Den utspädda bufferten är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Tvättlösning: utspädd tvättlösning (10 x) koncentrat 9550-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvättlösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas. Den utspädda tvättlösningen är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Kontrollsera: utspädd 10 µl kontrollsera 9550-06 till -08 i 190 µl spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/20). Det utspädda kontrollsera är stabilt i 2 månader vid 2-8°C.

Konjugat: utspädd konjugat 9550-09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: upplös tabletter av fosfatas substrat 9550-10 i utspädd buffert 9550-04 (1 tablett i 2,5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett/erna. Späd substratet på analysdagen och skydda röret från direkt ljus. Tabletter och substratlösningar borde vara färglösa, eller bara ha en ljusgul skiftning. Om en tablett eller en substratlösning blir gul kan den ha delvis hydrolyserats och bör kasseras. Förvara inte substratlösningen.

Stopplösning: använd reagens 9550-05 utspädd.

Provtagning och förberedning

Använd humant-serum. Serum bör förvaras vid 2-8°C om det analyseras inom några dagar, annars lagras vid -20°C eller lägre. Undvik upprepade frysning och upptining.

Vortexprover och späd 1/201 i spädningsbuffertlösning (t.ex. 5 µl prov i 1,0 ml).

Varningar och säkerhetsåtgärder:

Giftiga föreningar finns i följande koncentration:

| Komponent | Referens | Natriumazid (N _a N ₃) | Mertiolat |
|-------------------------|------------------|--|-----------|
| Spädningsbuffert (10 x) | 9550-02 | 0,1% | 0,02% |
| Tvättlösning (10 x) | 9550-03 | 0,05% | / |
| Enzybuffert | 9550-04 | 0,01% | / |
| Kontrollsera (20 x) | 9550-06 till -08 | 0,1% | 0,02% |
| Konjugat (50 x) | 9550-09 | 0,1% | / |

Vid de använda koncentrationerna har natriumazid och merthiolat ingen toxikologisk risk vid kontakt med hud och slemhinnor.

- Stopplösningen 9550-05 (0.5 M K₃PO₄) är irriterande.
- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (9550-06 till -08) är från kaniner.
- Behandla alla reagens och prov som potentiellt infektiöst material.
- Byt inte reagenser av olika partier eller Bordier ELISA-kit.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagens i denna utrustning.
- Använd inte reagens efter dess utgångsdatum.
- Stäng reagensflaskorna tätt omedelbart efter användning, och byt inte ut skruvlock för att undvika förorening.
- Använd separata och rena pipetter-tips för varje prov.
- Återanvänd inte mikrobrunnar.
- Undvik försämring av mikrobrunnarna genom mekanisk verkan (spetsar/koner, munstycken).
- Beskrivningarna av symboler som används på etiketterna finns på webbplatsen www.bordier.ch.

Avfallshantering:

Alla material som används för detta test anses allmänt som farligt avfall. Se nationella och regionala lagar och förordningar för bortskaffande av farligt avfall.

Procedur:

Vid körning av analysen, undvik bildandet av bubblor i brunnarna.

Steg 1: Blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningbuffertlösning.

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

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

Steg 2: Inkubation med prover:

Fyll den första brunnen i remsan med 100 µl spädningbuffert (inget serumblankt).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med respektive 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontrollsera. För analyser av mer än 25 prover rekommenderar vi att fylla de tre sista brunnarna med kontrollsera som ett duplikat.

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

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

Ta bort sera och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 3: Inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn (inklusive det inget serumblankt).

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

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 4: Inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

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

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

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Om det behövs, torka botten av brunnarna och eliminera bubblor. Mät absorbanserna vid 405 Nm inom 1 timme efter tillsatsen av stopplösning.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serumblankt från alla mätvärden. Beräkna de genomsnittliga absorbansvärdena för duplicerade serumkontroller när det är tillämpligt. Testet är giltigt om dem påföljande kriterierna uppfylls:

- absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200
- A av svagt positiv kontroll > 12% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 12% av A av positiv kontroll
- A av inget serumblankt < 0,350

Kvalitetskontroll av nuvarande partier publiceras på vår hemsida: www.bordier.ch.

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

Det skilda index av ett prov definieras efter subtraktion av det inget serumblankt ämne som:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbans prov}}{\text{Absorbans avskilt serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Entamoeba histolytica* antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när indexet av det analyserade provet är högre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Entamoeba histolytica* antigener är kliniskt icke signifikant. Det indikerar att patienten har haft kontakt med parasiten.

En gråzon kan definieras av varje laboratorium enligt patientpopulationen. Vid gränsöverskridande eller tveklaktiga resultat rekommenderar vi att du upprepar testet igen 2-4 veckor senare med ett nytt prov.

Vid positivt eller tveksamt resultat rekommenderar vi att du utför ett bekräftelsetest (oftast med western blot) om ett sådant test är tillgängligt eller krävs enligt nationella bestämmelser.

Analytiska prestationer:

Analytisk specificitet:

En specificitet på 80% fann man i 40 sera från patienter med andra parasitinfektioner. Korsreaktivitet uppträder huvudsakligen hos patienter med leishmaniasis, malaria, filarioser och strongyloidos.

Ingen positiv eller negativ interferens sågs när sera tillsatts suprafysiologiska koncentrationer av hemoglobin, lipider eller bilirubin.

Noggrannhet:

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 (absorbans) | 0,612 | 2,394 | 0,649 | 2,449 |
| Standardavvikelse (absorbans) | 0,040 | 0,162 | 0,041 | 0,162 |
| Variationskoefficient (%) | 6,5 | 6,8 | 6,3 | 6,6 |

Följande prestationer kan inte utvärderas eftersom det inte finns något certifierat referensmaterial för denna analys:

- Analytisk känslighet (gränser för detektion och kvantifiering)
- Noggrannhet
- Sannhet
- Mätområde
- Linjäritet

Kliniska prestationer:

Diagnostisk känslighet:

En sensitivitet på 100% fann man i 52 sera från patienter med invasiv amöbiasis.

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 96% fann man i 99 sera från schweiziska blodgivare. En specificitet på 89% fann man i 71 sera från patienter med misstänkt amöbiasis men där denna sjukdom med säkerhet har uteslutits.

Positivt och negativt prediktivt värde:

Man fann ett PPV på 81% och ett NPV på 100% i ovannämnda populationer.

Förväntade värden i normala och drabbade populationer:

I en normalpopulation med 71 sera från patienter med misstänkt amöbiasis men där denna sjukdom med säkerhet har uteslutits är det förväntade indexvärdet 0,57. I en infekterad population med 52 sera från patienter med invasiv amöbiasis är det förväntade indexvärdet 5,43.

Incidenter:

Varje allvarlig incident som inträffar i samband med produkten ska anmälas till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.

Begränsningar:

Diagnos av en infektionssjukdom bör inte upprättas på grundval av ett enda testresultat. En noggrann diagnos bör ta hänsyn till endemisk situation, klinisk historia, symptomatologi, bildbehandling och serologiska data. Hos immunförsvagade patienter och nyfödda är serologiska data av begränsat värde.

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

