

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Encimski imunski test za diagnozo invazivne amebiaze pri ljudeh

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 9550
Uredba ES št.: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA je namenjen kvantitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti *Entamoeba histolytica* v človeškem serumu. Serologija je pomoč pri diagnosticiranju in je ni mogoče uporabiti kot edino diagnostično metodo.

Ozadje:

Amebiaza je posledica protozoana *Entamoeba histolytica*, patogena amebe. Ljudje se lahko okužijo z nenamernim zaužitjem amebnih cist v kontaminirani hrani ali vodi. Najpogostejši simptomi se pojavijo v črevesnem stadiju (bolečina v želodcu in driska). Vendar pa bo v nekaterih primerih zajedavec postal zunajčrevesno invaziven in tako povzročil nastanek ognjoka večinoma v jetrih. Bolniki bodo imeli večinoma vročino in bolečine v trebuhu. Diagnoza zunajčrevesne amebiaze temelji na tehnikah slikanja, kot so posnetki računalniške tomografije, ultrazvok in magnetna resonanca za odkrivanje jetrne lezije in pozitiven rezultat serološkega testiranja. Serologija se uporablja tudi za izključitev amebiaze v okviru diferencialne diagnoze z drugimi boleznimi jeter.

Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z *Entamoeba histolytica* topnimi trofozoita antigeni. Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost zajedavsko specifičnih protiteles se odkrije s konjugatom proteina A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Entamoeba histolytica* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčitava z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test se lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, vendar mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

Material v kompletu (96 testov):

WELL	9550-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z <i>Entamoeba histolytica</i> topnimi trofozoita antigeni	96	vdolbinic
DILB	9550-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
WASH	9550-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Encimski pufer	50	ml
STOP	9550-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	µl
CONTROL +	9550-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	µl
CONJ	9550-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	µl
SUBS	9550-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablet
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet hranite pri 2° do 8°C (transport pri sobni temperaturi), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete pri 2-8°C.

Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in µl). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na 37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente segrejte na sobno temperaturo in jih pred uporabo premešajte.

Vdolbinice ELISA: odprite stran aluminijaste vrečke 9550-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 9550-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je pri 2-8°C stabilen 2 meseca.

Raztopina za pranje: razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 9550-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrum, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je pri 2-8°C stabilna 2 meseca.

Kontrolni serumi: razredčite 10 µl kontrolnega seruma 9550-06 do -08 v 190 µl raztopine pufra za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so pri 2-8°C stabilni 2 meseca.

Konjugat: razredčite konjugat 9550-09 v raztopini pufra za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

Raztopina substrata: raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 9550-10 v nerazredčenem encimskem pufru 9550-04 (1 tableta v 2,5 ml pufra). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtenek. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

Raztopina za zaustavitev: uporabite nerazredčen reagent 9550-05.

Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti pri 2-8°C, če ga analiziramo v nekaj dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju.

Vzorci premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufra za redčenje (na primer 5 µl vzorca v 1,0 ml).

Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N ₃ N ₃)	Mertiolat
Pufer za redčenje	9550-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	9550-03	0,05%	/
Encimski pufer	9550-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9550-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9550-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

- Raztopina za zaustavitev 9550-05 (0,5 M K₃PO₄) je dražilna.
- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (9550-06 do -08) so pridobljeni iz kuncev.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjajte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjajte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu www.bordier.ch.

Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

1. korak: Blokiranje:

Vdolbinice popolnoma napolnite z raztopino pufra za redčenje.

Inkubacija znaša 5 do 15 minut pri sobni temperaturi (blokiranje).

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufra za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 12% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 12% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani www.bordier.ch.

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov invazivne amebiaze in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 9550-07. Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Entamoeba histolytica* klinično nepomembna.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Entamoeba histolytica* klinično pomembna. To pomeni, da je imel bolnik stik s parazitom.

Vsak laboratorij lahko opredeli sivo cono glede na populacijo bolnikov. V primeru mejnih ali dvomljivih rezultatov priporočamo ponovitev testa ponovno po 2-4 tednih s svežim vzorcem.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

Analitične zmogljivosti:

Analitična specifičnost:

Pri 40 serumih bolnikov z drugimi zajedavskimi okužbami je bila ugotovljena 80-odstotna specifičnost testa. Navzkrižna reaktivnost se pojavlja večinoma pri bolnikih z lišmaniozo, malarijo, filariozo in strongiloidozo.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopoljenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

Natančnost:

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 10 vdolbinicah na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
Povprečje (absorbanca)	0,612	2,394	0,649	2,449
Standardni odklon (absorbanca)	0,040	0,162	0,041	0,162
Koeficient variacije (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Naslednjih zmogljivosti ni mogoče ovrednotiti, ker za to analizo ni certificiranega referenčnega materiala:

- Analitična občutljivost (meje zaznavnosti in kvantifikacije)
- Natančnost
- Resničnost
- Merilno območje
- Linearnost.

Klinične zmogljivosti:

Diagnostična občutljivost:

Pri 52 serumih bolnikov z invazivno amebiazo je bila ugotovljena 100-odstotna občutljivost testa.

Diagnostična specifičnost:

Pri 99 serumih (švicarskih) krvodajalcev je bila ugotovljena 96-odstotna specifičnost testa. Pri 71 serumih bolnikov s sumom na amebiazo, pri katerih je bila ta bolezen zagotovo izključena, je bila ugotovljena 89-odstotna specifičnost testa.

Pozitivna in negativna napovedna vrednost:

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 81% in NPV 100%.

Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:

Pri zdravi populaciji 71 serumov bolnikov s sumom na amebiazo, kjer je bila ta bolezen zagotovo izključena, je pričakovana indeksna vrednost 0,57. Pri prizadeti populaciji 52 serumov bolnikov z invazivno amebiazo je pričakovana indeksna vrednost 5,43.

Incidenti:

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

Omejitve:

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslABLjenim imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

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, Švica.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Faks: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

