

ProSpecT™ Προσδιορισμός μικροπλακών Entamoeba histolytica

REF	R2456048	48 εξετάσεις
REF	R2456096	96 εξετάσεις

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ
Ο προσδιορισμός μικροπλάκων Entamoeba histolytica της ProSpecT προορίζεται για την ανίχνευση των ειδικών αντιγόνων <i>E. histolytica</i> (EHSΑ) σε υδάτινα εκχυλίσματα δειγμάτων ανθρώπινων κοπράνων. Ο προσδιορισμός ανιχνεύει EHSΑ από παθογόνα και μη παθογόνα στελέχη του οργανισμού.
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Entamoeba histolytica* είναι μια εντερική αμοιβάδα που προκαλεί λοίμωξη μετά από την κατάποση κυστών. Περίπου 12% του παγκόσμιου πληθυσμού βιώνει μόλυνση από *E. histolytica*^{1,7}. Ενενήντα τοις εκατό των μολυσμένων ατόμων παρουσιάζουν ασυμπτωματικές λοιμώξεις και αντιπροσωπεύει μια σημαντική δεξαμενή μετάδοσης του οργανισμού. Περίπου το 10% των μολυσμένων ατόμων παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, τα οποία κυμαίνονται από μη ειδικά συμπτώματα της γαστρεντερικής νόσου έως δυσεντερία, κολίτιδα και αμοιβάδωση. Από αυτό το ποσοστό, υπολογίζεται κατ’ εκτίμηση ότι το 2 έως 20% θα εξελιχθεί με εξωεντερική εκδήλωση και σχηματισμό αποστημάτων, ιδιαίτερα στο ήπαρ^{1,7}.

Η διάγνωση της αμοιβάδωσης γίνεται κατά παράδοση με μικροσκοπική παρατήρηση αυγών και παρασίτων (Ο&Ρ) του οργανισμού σε δείγματα κοπράνων ή ιστών. Η μικροσκοπία είναι περίπλοκη εξαιτίας της ευαισθητής φύσης των τροφοζωιτών και τη διακοπτόμενη αποβολή των μορφών ζωής. Έχει αποδειχθεί ότι ακόμη με 6 έως 9 εξετάσεις Ο&Ρ, η διάγνωση επιτυγχάνεται μόνο στο 72 έως 76% των περιπτώσεων⁴. Σε μία μελέτη, η πιθανότητα διάγνωσης βάσει μίας εξέτασης Ο&Ρ ήταν μόλις 50% όταν εκκρίθηκαν 100.000 κύστες ημερησίως ή 0,45% όταν εκκρίθηκαν 1.000 κύστες³. Έχουν αναφερθεί σημαντικά προβλήματα από τη λανθασμένη διάγνωση της *E. histolytica*². Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα προκύπτουν όταν δεν γίνεται διάγνωση του παρασίτου εξαιτίας μη έμπειρων τεχνολόγων και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα προκύπτουν όταν γίνεται λανθασμένα αναγνώριση λευκοκυττάρων, άλλων αμοιβάδων, κυττάρων αίματος ή υπολειμμάτων ως *E. histolytica*².

Στην εξωεντερική αμοιβάδωση, οι οργανισμοί μπορεί να μην εκκρίνονται στα κόπρανα και ενδέχεται να χρειαστούν ορολογικές εξετάσεις για τη διάγνωση. Ωστόσο, προκύπτουν προβλήματα με τις ορολογικές εξετάσεις όταν οι τίτλοι αντισωμάτων είναι χαμηλοί ή δύσκολοι στην ερμηνεία. Σε ενδημικές περιοχές, το υψηλό ποσοστό επιπολασμού της οροθετικότητας περιπλέκει τη διάγνωση της τρέχουσας λοίμωξης. Ασυμπτωματικοί φορείς της κύστης ενδέχεται να επιφέρουν αρνητικά αποτελέσματα στον ορό¹. Η αντοχή στα αντιβιοτικά για παρατεταμένο χρονικό διάστημα μετά τη λοίμωξη περιπλέκει τη διάκριση μεταξύ τρέχουσας και παλιάς λοίμωξης.

Ο πολλαπλασιασμός της *E. histolytica* στην εντερική οδό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ειδικών αντιγόνων (EHSΑ) που υπάρχουν στα κόπρανα των προσβεβλημένων ατόμων. Τα αντιγόνα EHSΑ μπορούν να ανιχνευτούν με ένα μοναδικό δείγμα κοπράνων σε σύγκριση με τα πολλαπλά δείγματα κοπράνων που απαιτούνται για την εξέταση Ο&Ρ. Η ανίχνευση των αντιγόνων EHSΑ εξαλείφει τα συνηθισμένα διαγνωστικά προβλήματα, όπως λανθασμένη αναγνώριση, αποτυχία σωστής αναγνώρισης των οργανισμών και αντοχή ή απουσία τίτλων αντισωμάτων. Ο προσδιορισμός μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT είναι ένας προσδιορισμός για την ανίχνευση EHSΑ.

3. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ
Ο προσδιορισμός μικροπλάκων Entamoeba histolytica της ProSpecT είναι ένας ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης για την ανίχνευση EHSΑ ⁶ .

Προστίθενται αραιωμένα δείγματα κοπράνων σε αποσπώμενες υποδοχές μικροπλάκων επάνω στις οποίες δεσμεύονται αντισώματα αντι-EHSΑ. Εάν υπάρχει EHSΑ, αυτό «συλλαμβάνεται» από το αντίσωμα δέσμευσης. Ακολουθεί επώαση των υποδοχών και κατόπιν πλένονται για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο υλικό. Προστίθεται το συζυγές ένζυμο (αντίσωμα αντι-EHSΑ σημασμένο με ένζυμο υπεροξειδάση χρένου).

Ακολουθεί επώαση των υποδοχών και κατόπιν πλένονται για να απομακρυνθεί το αδέσμευτο συζυγές ένζυμο. Σε θετική αντίδραση, το EHSΑ δεσμεύει το συζυγές ένζυμο στην υποδοχή. Προστίθεται το υπόστρωμα για το ένζυμο, 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB), και παράγεται ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η παραγωγή χρώματος μπορεί να ανιχνευτεί οπτικά ή φασματοφωτομετρικά. Σε αρνητική αντίδραση, δεν υπάρχει καθόλου EHSΑ ή υπάρχει ανεπαρκές επίπεδο EHSΑ για τη δέσμευση του συζυγούς ενζύμου και δεν αναπτύσσεται κανένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης.

4. ΟΡΙΣΜΟΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ	
REF	Αριθμός καταλόγου
IVD	In Vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Περιεχόμενο επαρκές για <n> εξετάσεις
	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασιακοί περιορισμοί (Θερμοκρασία αποθήκευσης)
LOT	Κωδικός παρτίδας (Αριθμός παρτίδας)
	Ημερομηνία λήξης
	Παρασκευαστής
DILUTED SAMPLE	Αραιωμένο δείγμα

5. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΚΙΤ, ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

Ο προσδιορισμός μικροπλάκων Entamoeba histolytica της ProSpecT περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για τη διεξαγωγή  48 ή  96 εξετάσεων.

Βλ. **επίσης Προφυλάξεις**, ενότητα 6.

Η ημερομηνία λήξης κάθε κιτ αναγράφεται στην ετικέτα της συσκευασίας.

Φυλάξτε όλα τα συστατικά στους 2 έως 8°C.

Πριν από τη χρήση, περιμένετε μέχρι τα αντιδραστήρια να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) και αναμείξτε

προσεκτικά. Μετά τη χρήση, επιστρέψτε τα αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια στο ψυγείο.

Ολα τα αντιδραστήρια εκτός από το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης παρέχονται σε συγκέντρωση εργασίας. Τα αντιδραστήρια μπορούν να διανεμηθούν απευθείας από τα σταγονομετρικά φιαλίδια ή να χρησιμοποιηθούν με πιπέτες πολλαπλών καναλιών. Εάν έχει διοχετευθεί περίσσεια ποσότητα των αντιδραστηρίων, η περίσσεια πρέπει να απορριφτεί. Μη διοχετεύετε την περίσσεια ποσότητα του αντιδραστηρίου ξανά στο φιαλίδιο.



Οδηγίες χρήσης
Πιπέτες μεταφοράς
Βάση στήριξης ταινιών και κάλυμμα μικροπλάκας
Κάρτα διαδικασίας

Μικροπλάκα* (8 υποδοχές / ταινία)
6 ταινίες (R2456048) ή 12 ταινίες (R2456096) επικαλυμμένες με αντισώματα αντι-EHSΑ κουνελιού. Οι αχρησιμοποίητες ταινίες μικροπλάκας πρέπει να φυλάσσονται στη μεμβρανώδη σακούλα που περιέχει τον αποξηραντικό παράγοντα για την απομάκρυνση της υγρασίας.

CONJUGATE

Συζυγές ένζυμο*
Ενα σταγονομετρικό φιαλίδιο που περιέχει 12 ml (R2456048) ή 25 ml (R2456096) αντι- EHSΑ κουνελιού, σημασμένο με υπεροξειδάση χρένου, σε πρωτεϊνική θεμέλια ουσία που περιέχει βόειο ορό και αντιμικροβιακούς παράγοντες.

CONTROL +

Θετικό υλικό ελέγχου
Ενα σταγονομετρικό φιαλίδιο που περιέχει 4 ml κεκαθαρμένου EHSΑ σε πρωτεϊνική θεμέλια ουσία με αντιμικροβιακούς παράγοντες.

CONTROL –

Αρνητικό υλικό ελέγχου
Ενα σταγονομετρικό φιαλίδιο που περιέχει 4 ml πρωτεϊνικής θεμέλιας ουσίας με ερυθρή χρωστική και αντιμικροβιακούς παράγοντες.

SAMPLE DILUENT

Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης δείγματος
Ενα φιαλίδιο που περιέχει 120 ml ρυθμιστικό διάλυμα με ορό κουνελιού, ερυθρή χρωστική και αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
Ενα φιαλίδιο που περιέχει 120 ml (x10) συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα με αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Αραιώστε (x10) το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (x1) προσθέτοντας 1 μέρος συμπυκνώματος σε 9 μέρη απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού. Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 1 μήνα όταν αποθηκεύεται στους 2 έως 8°C.

SUBSTRATE TMB
Έγχρωμο υπόστρωμα
Ενα σταγονομετρικό φιαλίδιο που περιέχει 12 ml (R2456048) ή 25 ml (R2456096) 3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) σε ρυθμιστικό διάλυμα.

Το έγχρωμο υπόστρωμα πρέπει να φυλάσσεται στο φωτοπροστατευμένο φιαλίδιο μέσα στο οποίο παρέχεται, αλλά και να χρησιμοποιείται από αυτό. Εάν ένα κλάσμα αφαιρεθεί από το αρχικό φιαλίδιο για οποιονδήποτε λόγο, μην επιστρέψετε το αχρησιμοποίητο έγχρωμο υπόστρωμα στο αρχικό φιαλίδιο.

STOP SOLUTION
Ανασχετικό διάλυμα
Ενα σταγονομετρικό φιαλίδιο που περιέχει 12 ml 0,46 mol/l Θεικό οξύ.

***Σημείωση:** Μην εναλλάσσετε αντιδραστήρια μεταξύ κιτ με διαφορετικούς αριθμούς παρτίδας.

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ
IVD

Τα αντιδραστήρια προορίζονται για *in vitro* διαγνωστική χρήση μόνο.

Για επαγγελματική χρήση μόνο.

Ανατρέξτε στο δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS) και τις επισημάνσεις του προϊόντος για επιπλέον πληροφορίες σχετικά με πιθανές επικίνδυνα συστατικά.

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΣΦΑΛΕΙΑ

6.1. Τα αντιδραστήρια προετοιμάζονται από βιολογικά υλικά και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται σαν να ήταν δυνητικά μολυσματικό υλικό. Απορρίψτε χρησιμοποιώντας κατάλληλες βιοεπικίνδυνες διαδικασίες.

6.2. Μην αναρροφάτε με πιπέτα υλικά με το στόμα. Φοράτε αναλώσιμα γάντια και προστασία για τα μάτια κατά το χειρισμό δειγμάτων και τη διεξαγωγή του προσδιορισμού. Πλύντε πολύ καλά τα χέρια σας όταν τελειώσετε.

6.3. Τα δείγματα ενδέχεται να περιέχουν λοιμώδεις παράγοντες και ο χειρισμός τους θα πρέπει να γίνεται σε επίπεδο βιοασφάλειας 2 όπως συνιστάται στο εγχειρίδιο CDC/NIH, «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories», 5η έκδοση.

6.4. Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης περιέχει δυνητικά δερματικό ευαισθητοποιητή (< 1% κ.ό.). Αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα. Φοράτε αναλώσιμα γάντια βινιλίου ή νιτριλίου.

6.5. Απορρίψτε το χρησιμοποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε κατάλληλους περιέκτες για βιοεπικίνδυνα υλικά.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

6.6. Διαβάστε προσεκτικά και ακολουθήστε όλες τις οδηγίες στις Οδηγίες χρήσης.

6.7. Τα αντιδραστήρια παρέχονται στην απαιτούμενη συγκέντρωση εργασίας, με εξαίρεση το συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Μην αραιώνετε αντιδραστήρια, εκτός εάν δοθούν οδηγίες.

6.8. Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά τις ημερομηνίες λήξης. Οι ημερομηνίες λήξης αναγράφονται στην ετικέτα κάθε αντιδραστηρίου. Η χρήση των

- αντιδραστηρίων μετά την ημερομηνία λήξης ενδέχεται να επηρεάσει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.
- 6.9. Τα ακόλουθα κοινά αντιδραστήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλη τη σειρά προϊόντων ProSpecT: ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, έγχρωμο υπόστρωμα και ανασχετικό διάλυμα.
- 6.10. Η μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων ενδέχεται να μειώσει την ακρίβεια του προσδιορισμού. Αποφύγετε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων με τη χρήση αποστειρωμένων αναλώσιμων πιπετών κατά την αφαίρεση των κλασμάτων από τα φιαλίδια αντιδραστηρίων.
- 6.11. Περιμένετε μέχρι όλα τα αντιδραστήρια και δείγματα να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) πριν από τη χρήση.
- 6.12. Οι ταινίες μικροπλάκας πρέπει να φυλάσσονται στην επανασφαγιζόμενη μεμβρανώδη σακούλα, για να προστατεύονται οι υποδοχές μικροπλάκας από την υγρασία.
- 6.13. Τα δείγματα κοπράνων πρέπει να αναμειγνύονται πολύ καλά πριν από την επεξεργασία του δείγματος για να εξασφαλιστεί η ακριβής αντιπροσώπευση του δείγματος. ΜΗΝ ΣΥΜΠΥΚΝΩΝΕΤΕ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ.
- 6.14. Το έγχρωμο υπόστρωμα είναι ευαίσθητο στην έκθεση στο φως. Εάν το αντιδραστήριο εκτεθεί στο φως και αναπτύξει χρώμα, το αντιδραστήριο πρέπει να απορριφθεί.
- 6.15. Τα άτομα με αχρωματοψία ή με μειωμένη όραση ενδέχεται να μην μπορούν να διαβάσουν οπτικά την εξέταση και πρέπει να χρησιμοποιούν φασματοφωτομετρικές ενδείξεις για να ερμηνεύουν τα αποτελέσματα.
- 6.16. Προσθέστε τα αντιδραστήρια στις υποδοχές εξέτασης με την ίδια σειρά καθ' όλη τη διαδικασία. Για να αποφύγετε τη μόλυνση, μην αγγίζετε το υγρό μέσα στις υποδοχές με τα άκρα των φιαλιδίων.
- 6.17. Χρονομετρήστε κάθε επώαση με ακρίβεια. Αρχίστε να χρονομετράτε αφού προσθέσετε το αντιδραστήριο στην τελευταία υποδοχή σε κάθε μικροπλάκα που εξετάζετε. Για να εξασφαλιστεί η ακριβής χρονομέτρηση, να μην επεξεργάζεστε περισσότερες από 96 πλάκες υποδοχών ταυτόχρονα. Η απόκλιση από την επιβεβαιωμένη διαδικασία ενδέχεται να μεταβάλλει την απόδοση του προσδιορισμού.
- 6.18. Είναι σημαντικό να κρατάτε τα σταγονομετρικά φιαλίδια κάθετα και η σταγόνα να σχηματίζεται στη μύτη του στομίου. Εάν το στόμιο υγρανθεί, σχηματίζεται μια σταγόνα από λανθασμένη ογκομετρική ποσότητα γύρω από το άκρο και όχι στη μύτη. Εάν συμβεί αυτό, στεγνώστε το στόμιο πριν από την επεξεργασία.
- 7. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ**
- Τα δείγματα κοπράνων που έχουν συγκεντρωθεί ή συλλεχθεί σε στερεωτικά 10% φορμόλη, SAF ή PVA δεν είναι κατάλληλα για χρήση.
- ΠΡΟΣΦΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ** Τα μη διατηρημένα δείγματα κοπράνων πρέπει να συλλέγονται σε καθαρούς, στεγανούς πλαστικούς περιέκτες. Τα δείγματα πρέπει να φυλαχθούν στους 2 έως 8°C και να εξεταστούν εντός 48 ωρών.

- ΚΑΤΑΨΥΓΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ** Εάν δεν είναι δυνατή η εξέταση των δειγμάτων εντός 48 ωρών, θα πρέπει να καταψυχθούν στους -20 έως -70°C.
- ΜΕΣΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ CARY BLAIR** Τα δείγματα κοπράνων που συλλέγονται σε μέσο μεταφοράς Cary Blair θα πρέπει να διατηρηθούν στο ψυγείο στους 2 έως 8°C και να εξεταστούν εντός 1 εβδομάδας από τη συλλογή.
- 8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ**
- ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΠΑΡΥΧΟΝΤΑΙ**
- Βλ. Περιεχόμενα κιτ, ενότητα 5
- ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**
- Δοχεία συλλογής δειγμάτων κοπράνων
Χρονομετρητής που μετράει σε λεπτά
Φιάλη πλύσης για ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**
- Συσκευή ανάνγωσης μικροπλακών με δυνατότητα ανάνγωσης στα 450 nm ή στα 450/620 έως 650 nm
Στειλείο εφαρμογής με μύτη από βαμβάκι ή ραιγόν
Μικροπιπέτα που διανέμει όγκους έως 200 μl
Πλαστικό ή γυάλινο αναλώσιμο δοκιμαστικός σωλήνες
Συσκευή Vortex με προσαρμογέα πλάκας ή συσκευή ανακίνησης
- ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**
- 8.1. **Προετοιμασία δείγματος για τον προσδιορισμό:**
- Προετοιμάστε αραιώσεις 1:10 κ.ό. κάθε δείγματος κοπράνων.
- | | |
|----|---|
| 1. | Αποψύξτε τα κατεψυγμένα δείγματα κοπράνων. Πρέπει να πραγματοποιηθεί εκτενής γαλακτωματοποίηση των δειγμάτων κοπράνων με έντονη ανακίνηση ή περιδίνηση για την εξασφάλιση ομοιόμορφης διανομής του αντιγόνου. |
| 2. | Επισημάνετε τον απαιτούμενο αριθμό σωληναρίων με το αναγνωριστικό ασθενή. |
| 3. | Μεταφέρετε με πιπέτα ή εκχύστε 1 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δείγματος σε κάθε σωληνάριο. |
| 4. | Για στερεά ή ημιστερεά δείγματα, χρησιμοποιήστε ένα στειλεό καλά επικαλυμμένο με υλικό κοπράνων. Για υγρά δείγματα, χρησιμοποιήστε 3 στειλεούς ή 300 μl . |
| 5. | Περιστρέψετε το(υς) στειλεό(ούς) εφαρμογής μερικές φορές στο ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δείγματος για εναιώρηση του υλικού κοπράνων στο διάλυμα. Κατόπιν, κυλίστε το(ους) στειλεό(ούς) εφαρμογής σταθερά στα τοιχώματα του φιαλιδίου για τη λήψη όσο το δυνατό περισσότερου υγρού. Απορρίψτε τους στειλεούς εφαρμογής κατάλληλα. Τα παρασκευασμένα δείγματα μπορούν να παραμείνουν στο ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) για έως 8 ώρες ή στο ψυγείο (2 έως 8°C) για έως 48 ώρες πριν από την εξέταση. |
- 8.2. Ανοίξτε τη μεμβρανώδη θήκη, αφαιρέστε τον απαραίτητο αριθμό ταινιών μικροπλακών και τοποθετήστε τις στη βάση στήριξης ταινιών μικροπλάκας. Χρησιμοποιήστε μία υποδοχή ή το αρνητικό υλικό ελέγχου και μία για το θετικό υλικό ελέγχου. Αν χρησιμοποιείτε λιγότερες από 8 υποδοχές, αφαιρέστε τον απαραίτητο αριθμό υποδοχών από μια ταινία και τοποθετήστε τις μη χρησιμοποιημένες

- υποδοχές στη μεμβρανώδη θήκη με τον αποξηραντικό παράγοντα. ΕΠΑΝΑΞΦΡΑΓΙΣΤΕ ΚΑΛΑ ΤΗ ΘΗΚΗ ΓΙΑ ΝΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΕΤΕ ΤΗΝ ΥΓΡΑΣΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΡΕΨΤΕ ΣΤΟ ΨΥΓΕΙΟ.
- 8.3. Προσθέστε **4 σταγόνες** (200 μl) αρνητικό υλικό ελέγχου, θετικό υλικό ελέγχου ή αραιωμένο δείγμα ασθενή σε ξεχωριστές υποδοχές προσέχοντας να μην μολύνετε τις περιβάλλουσες υποδοχές. Μπορείτε να διανέμετε τα υλικά ελέγχου απευθείας από το σταγονομετρικό φιαλίδιο στην κατάλληλη υποδοχή ή, εάν επιθυμείτε, μπορείτε να μεταφέρετε με πιπέτα 200 μl από το φιαλίδιο.
- 8.4. **Καλύψτε** τη μικροπλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) για **60 λεπτά**. Αρχίστε τη χρονομέτρηση μετά από την προσθήκη του τελευταίου δείγματος.
- 8.5. Αφαιρέστε με ανακίνηση ή αναρροφήστε το περιεχόμενο των υποδοχών. Πλύνετε γεμίζοντας πλήρως κάθε υποδοχή με **αραιωμένο** ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (περίπου 350-400 μl/υποδοχή). Τινάζτε μέχρι να απομακρυνθεί ή αναρροφήστε όλο το υγρό από τις υποδοχές μετά από κάθε πλύση. Πλύνετε συνολικά **3 φορές**. Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρέστε το περιεχόμενο και σκουπίστε την πλάκα με καθαρές χάρτινες πετσέτες ή εκτελέστε αναρρόφηση. Αφαιρέστε όσο το δυνατό περισσότερο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, αλλά μην αφήσετε τις υποδοχές να στεγνώσουν οποιαδήποτε στιγμή.
- 8.6. Προσθέστε **4 σταγόνες** (200 μl) συζυγές ένζυμο σε κάθε πλάκα.
- 8.7. **Καλύψτε** τη μικροπλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) για **30 λεπτά**.
- 8.8. Τινάζτε μέχρι να απομακρυνθεί ή αναρροφήστε και πλύντε κάθε υποδοχή **5 φορές** όπως στο βήμα 8.5.
- 8.9. Προσθέστε **4 σταγόνες** (200 μl) έγχρωμο υπόστρωμα σε κάθε πλάκα.
- 8.10. **Καλύψτε** τη μικροπλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C) για **10 λεπτά**.
- 8.11. Προσθέστε **1 σταγόνα** (50 μl) ανασχετικό διάλυμα σε κάθε υποδοχή. Χτυπήστε απαλά ή αναμίξτε σε συσκευή Vortex τις υποδοχές μέχρι το κίτρινο χρώμα να είναι ομοιόμορφο. Διαβάστε τις αντιδράσεις εντός **10 λεπτών** μετά την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος.
- 8.12. Διαβάστε οπτικά ή φασματοφωτομετρικά στα 450 nm (μονό μήκος κύματος) ή στα 450/620 έως 650 nm (δύπλο μήκος κύματος).
- 9. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ**
- Τα θετικά και αρνητικά υλικά ελέγχου πρέπει να περιλαμβάνονται κάθε φορά που πραγματοποιείται η εξέταση. Τα θετικά και αρνητικά υλικά ελέγχου εξημερετούν για τον έλεγχο των αντιδραστηρίων και της διαδικασίας. Τα υλικά ελέγχου προορίζονται για την παρακολούθηση τυχόν ουσιωδών αποτυχίας των αντιδραστηρίων. Το θετικό υλικό ελέγχου δεν διασφαλίζει την ακρίβεια στην τιμή αποκλεισμού του προσδιορισμού.
- Η οπτική πυκνότητα (Ο.Π.) του αρνητικού υλικού ελέγχου πρέπει να είναι 123456 0,100 στα 450 nm ή 123456 0,070 στα 450/620 έως 650 nm. Το αρνητικό υλικό ελέγχου πρέπει να είναι άχρωμο όταν προσδιορίζεται οπτικά. Εάν υπάρχει κίτρινο χρώμα ίσο με

- ή μεγαλύτερο από 1+ στην κάρτα διαδικασίας για το αρνητικό υλικό ελέγχου, η εξέταση πρέπει να επαναληφθεί με ιδιαίτερη προσοχή στη διαδικασία πλύσης.
- Η Ο.Π. του θετικού υλικού ελέγχου πρέπει να είναι 123456 0,300 στα 450 nm ή 450/620 έως 650 nm, αφού αφαιρεθεί η Ο.Π. του αρνητικού υλικού ελέγχου και πρέπει να είναι ίση με ή μεγαλύτερη από την αντίδραση 2+ όταν προσδιορίζεται οπτικά. Εάν υπάρχει κίτρινο χρώμα ίσο ή μεγαλύτερο από 2+ στην κάρτα διαδικασίας για το θετικό υλικό ελέγχου, καλέστε για τεχνική βοήθεια.
- 10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**
- Ανατρέξτε στην εσωκλειόμενη κάρτα διαδικασίας για τις ερμηνείες των χρωμάτων.**
- ΟΠΤΙΚΑ**
- 10.1. Προσδιορίστε τα αποτελέσματα εξέτασης με σύγκριση με τα χρώματα αντίδρασης στην κάρτα διαδικασίας.
- Θετικό:** Κίτρινο χρώμα με ένταση 1+ τουλάχιστον
Αρνητικό: Αχρωμο
- 10.2. Ερμηνεία των οπτικών αποτελεσμάτων:
- Θετικό:** Εάν το κίτρινο χρώμα με ένταση 1+ τουλάχιστον αναπτύσσεται στην υποδοχή εξέτασης, το δείγμα περιέχει ΕHSA και η εξέταση είναι θετική.
Σημείωση: Οι εξετάσεις με αμυδρό κίτρινο χρώμα (λιγότερο από 1+) πρέπει να επαναληφθούν.
Αρνητικό: Μια άχρωμη αντίδραση είναι αρνητικό αποτέλεσμα και υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ΕHSA ή δεν υπάρχει ανιχνεύσιμο επίπεδο ΕHSA στο δείγμα που εξετάστηκε.
- ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΑ**
- 10.3. Προσδιορίστε τα αποτελέσματα σε μονό (450 nm) ή δυπλό (450/ 620 έως 650 nm) μήκος κύματος.
- 10.4. Προσδιορίστε την οπτική πυκνότητα (Ο.Π.) για το αρνητικό υλικό ελέγχου
- 10.5. Αφαιρέστε την Ο.Π. της υποδοχής με το αρνητικό υλικό ελέγχου από τις ενδείξεις Ο.Π. της υποδοχής με το θετικό υλικό ελέγχου και τις υποδοχές εξέτασης πριν ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα.
- Σημείωση:** Οι συσκευές ανάνγωσης μπορεί να μηδενιστούν με βάση την υποδοχή με το αρνητικό υλικό ελέγχου ώστε η Ο.Π. της υποδοχής του αρνητικού υλικού ελέγχου να αφαιρείται αυτόματα από όλες τις άλλες ενδείξεις. Εάν η συσκευή ανάνγωσης δεν έχει αυτή τη δυνατότητα, μηδενίστε με τον αέρα και αφαιρέστε την Ο.Π. της υποδοχής με το αρνητικό υλικό ελέγχου από τις ενδείξεις Ο.Π. της υποδοχής με το θετικό υλικό ελέγχου και τις υποδοχές εξέτασης πριν ερμηνεύσετε τα αποτελέσματα.
- 10.6. Ανάνγωση των αποτελεσμάτων εξέτασης:
- Θετικό:** Ενδείξεις Ο.Π. 123456 0,050 διορθωμένης τιμής (δηλ. αφού αφαιρεθεί η Ο.Π. του αρνητικού υλικού ελέγχου)
Αρνητικό: Ενδείξεις Ο.Π. 123456 0,050 διορθωμένης τιμής (δηλ. αφού αφαιρεθεί η Ο.Π. του αρνητικού υλικού ελέγχου)
- 10.7. Ερμηνεία των φασματοφωτομετρικών αποτελεσμάτων:
- Θετικό:** Εάν η ένδειξη της διορθωμένης Ο.Π. είναι ίση με ή μεγαλύτερη από 0,050 στην υποδοχή εξέτασης, το δείγμα περιέχει ΕHSA και η εξέταση είναι θετική.

Αρνητικό: Μια διορθωμένη ένδειξη Ο.Π. που είναι μικρότερη από 0,050 είναι αρνητικό αποτέλεσμα και υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ΕHSA ή υπάρχει μη ανιχνεύσιμο επίπεδο ΕHSA στο δείγμα που εξετάστηκε.

***Σημείωση:** Οποιοσδήποτε υποδοχές που είναι οπτικά άχρωμες αλλά δίνουν ένδειξη Ο.Π. που δεν είναι συνεπής με την οπτική ερμηνεία πρέπει να θεωρηθούν ασύμφωνη ένδειξη και να εξεταστούν για παρουσία φυσαλίδων, μικρών σωματιδίων στις υποδοχές ή αδιαφανούς μεμβράνης στο κάτω μέρος της υποδοχής. Για να απομακρύνετε τη μεμβράνη, σκουπίστε το κάτω μέρος των υποδοχών και προσδιορίστε την Ο.Π. ξανά. Εάν επιμένει η ασυμφωνία μεταξύ της οπτικής ένδειξης και της Ο.Π., επαναλάβετε την εξέταση.

11. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΑΠΑΔΟΣΗΣ

Η εγκρότητα των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT εξαρτάται από το εάν η αντίδραση ελέγχου πραγματοποιείται με τον αναμενόμενο τρόπο. Βλ. **Ποιοτικός έλεγχος**, ενότητα 9.

Ενα αρνητικό αποτέλεσμα εξέτασης δεν αποκλείει την πιθανότητα της παρουσίας *Entamoeba histolytica* και ενδέχεται να προκύπτει όταν το επίπεδο αντιγόνου στο δείγμα είναι χαμηλότερο από το επίπεδο ανίχνευσης της εξέτασης. Η συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας αντιγόνου στο δείγμα και της κλινικής παρουσίας δεν έχει καθοριστεί ακόμη.

Όπως συμβαίνει με όλες τις IN VITRO διαγνωστικές εξετάσεις, τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνεύονται από τον κλινικό ιατρό σε συνδυασμό με κλινικά ευρήματα ή/και άλλα διαγνωστικά αποτελέσματα.

Η σωστή συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων είναι ουσιαστικό παράγοντες για την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης του προσδιορισμού. Τα βέλτιστα αποτελέσματα εξέτασης λαμβάνονται από δείγματα που εξετάστηκαν όσο το δυνατό πιο σύντομα μετά τη συλλογή τους. Βλ. **Συλλογή δειγμάτων κοπράνων**, ενότητα 7.

Ο προσδιορισμός μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT έχει ταξινομηθεί ως υψηλά σύνθετος.

12. ΑΝΑΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Το *Entamoeba histolytica* προσβάλλει περίπου το 12% του ανθρώπινου πληθυσμού¹. Η πλειονότητα αυτών των λοιμώξεων είναι ασυμπτωματικές, περίπου το 10% των προσβεβλημένων ατόμων παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, τα οποία κυμαίνονται από μη ειδικά συμπτώματα της γαστρεντερικής νόσου έως εξωεντερικές αλλοιώσεις¹. Στις Η.Π.Α., αναφέρονται στα Centres for Disease Control κατά μέσο όρο 3.500 περιστατικά αμοιβάδωσης το έτος². Οι αναγνωρισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου περιλαμβάνουν ταξιδιώτες, μετανάστες, μετανάστες εργάτες, ανοσοκατεσταλμένα άτομα, άτομα σε ψυχιατρικά ιδρύματα και σεξουαλικά ενεργούς ομοφυλόφιλους άνδρες¹. Στους ομοφυλόφιλους άνδρες, επικρατεί το μη παθολόγο στέλεχος του οργανισμού⁵. Οι ασυμπτωματικοί φορείς των παθογόνων στελεχών αντιπροσωπεύουν μια σημαντική δεξαμενή μετάδοσης¹.

13. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΑΤΗΤΑ

Η απόδοση του προσδιορισμού μικροπλακών (ΕΙΑ) Entamoeba histolytica της ProSpecT καθορίστηκε με 268 πρόσφατα, κατεψυγμένα δείγματα κοπράνων. Ενα μεγάλο εργαστήριο κλινικής αναφοράς παρείχε 105 δείγματα που ήταν θετικά για το *E. histolytica* με εξέταση αυγών και παρασπίτων (Ο&Ρ). Τα

δείγματα αυτά καταψύχθηκαν και αποθηκεύτηκαν για περίπου 2 έως 3 έτη πριν την εξέταση σε προσδιορισμό μικροπλακών. Από αυτά, τα 91 ήταν θετικά τόσο μέσω εξέτασης Ο&Ρ όσο και μέσω ΕΙΑ και τα 14 ήταν αρνητικά μέσω ΕΙΑ.

Υπήρχαν 163 πρόσφατα, κατεψυγμένα δείγματα αρνητικά με την εξέταση Ο&Ρ για *E. histolytica*. Τα δείγματα αυτά αποθηκεύτηκαν για περίπου 6 μήνες. Από αυτά, τα 48 είχαν παράσιτα διαφορετικά από το *E. histolytica*. Και τα 48 δείγματα ήταν αρνητικά για το *E. histolytica* μέσω ΕΙΑ. Τα υπόλοιπα 115 δείγματα δεν είχαν κανένα παράσιτο μέσω της εξέτασης Ο&Ρ, τα 114 ήταν αρνητικά μέσω ΕΙΑ και ένα ήταν θετικό.

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης του προσδιορισμού μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT συνοψίζονται παρακάτω. Η πραγματική ευαισθησία του προσδιορισμού ενδέχεται να είναι υψηλότερη από τη δεδομένη επειδή η συχνότητα των ψευδών θετικών εξετάσεων Ο&Ρ είναι καλά τεκμηριωμένη².

		Ο&Ρ		
		+	-	
ProSpecT	+	91	1	
Entamoeba histolytica	-	14	162	
		105	163	

Ευαισθησία = 87%

Ειδικότητα = 99%

Προβλεπόμενη τιμή θετικού = 99%

Προβλεπόμενη τιμή αρνητικού = 92%

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Ο προσδιορισμός μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT ανιχνεύει κατά προσέγγιση 40 nanograms/ml ΕHSA.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΑΤΗΤΑ

Ο συντελεστής διακύμανσης (CV) μεταξύ προσδιορισμών ή μεταξύ σειράς αναλύσεων του προσδιορισμού μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT αξιολογήθηκε με επιλογή τεσσάρων θετικών δειγμάτων με ποικίλες ενδείξεις οπτικής πυκνότητας. Κάθε δείγμα εξετάστηκε σε 8 υποδοχές ανά ημέρα για πέντε διαδοχικές ημέρες. Η μέση τιμή του συντελεστή διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών ήταν 4,8%.

Δείγμα	Μέση τιμή Ο.Π.	Τυπική απόκλιση	% CV
1	0,950	0,0210	2,20
2	0,620	0,0143	2,30
3	0,450	0,0355	7,90
4	0,260	0,0179	6,90

Ο συντελεστής διακύμανσης (CV) για τον ίδιο προσδιορισμό ή για την ίδια σειρά αναλύσεων αξιολογήθηκε με την εξέταση 24 υποδοχών με κάθε ένα από τα 4 θετικά δείγματα. Η μέση τιμή του συντελεστή διακύμανσης για τον ίδιο προσδιορισμό ήταν 3,4%.

Δείγμα	Μέση τιμή Ο.Π.	Τυπική απόκλιση	% CV
1	1,086	0,0242	2,23
2	0,685	0,0242	3,54
3	0,481	0,0207	4,31
4	0,289	0,0100	3,50

ΔΙΑΣΤΑΥΡΟΕΜΝΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΙΚΑΤΗΤΑ

Ο προσδιορισμός μικροπλακών Entamoeba histolytica της ProSpecT δοκιμάστηκε με δείγματα κοπράνων που βρέθηκαν θετικά μέσω Ο&Ρ για ένα πλήθος παράσιτων σε κόπρανα. Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με κανέναν από τους μολυσματικούς παράγοντες που παρατίθενται κατωτέρω.

<i>Ascaris lumbricoides</i> (4)	Αγκυλόστομα (1)
<i>Blastocystis hominis</i> (5)	<i>Hymenolepis nana</i> (1)
<i>Chilomastix mesnili</i> (1)	<i>Iodamoeba butschlii</i> (1)
<i>Cryptosporidium parvum</i> (6)	<i>Isospora</i> spp. (2)
<i>Dientamoeba fragilis</i> (5)	<i>Strongyloides stercoralis</i> (2)
<i>Endolimax nana</i> (4)	<i>Taenia</i> spp. (1)
<i>Entamoeba coli</i> (4)	<i>Trichuris hominis</i> (2)
<i>Entamoeba hartmanni</i> (2)	<i>Trichuris trichiura</i> (4)
<i>Giardia lamblia</i> (5)	

Οι αριθμοί σε παρενθέσεις υποδεικνύουν το πλήθος των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

14. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bruckner, D.A., 1992.

Amoebiasis.
Clin. Microbiol. Rev. 5(4):356-369.

2. Krogstad, D.J., H.C. Spencer, G.R. Healy, N.N. Gleason, D.J. Sexton, C.A. Herron. 1978.

Amoebiasis: Epidemiologic Studies in the United States, 1971-1974.
Ann. Int. Med., 88:89-97.

3. Marsden, A.P.H. and H.F. Smith, 1946.

The detection of the cysts of *E. histolytica* in the faeces by microbiology examinations.
Med. J. Ant:II, 915-919.

4. Stamm, W. P., 1957.

The Laboratory Diagnosis of Clinical Amoebiasis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51:306-312.

5. Tannich, E. and G.D. Burchard, 1991.

Differentiation of Pathogenic from Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by Restriction Fragment Analysis of a Single Gene Amplified In Vitro.
J. Clin. Microbiol., 29(2):250-255.

6. Tijssen, P., 1985.

Practice and Theory of Enzyme Immunoassays.
Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier, N.Y. pp. 14-16.

7. Walsh, J.A., 1986.

Problems in Recognition and Diagnosis of Amoebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality.
Rev. Inf. Dis. 8(2):228-238.

Το ProSpecT™ είναι σήμα κατατεθέν της Remel Inc.



Oxoid Ltd Wade Road Basingstoke Hants, RG24 8PW
UK (Ηνωμ. Βασίλειο)

Για τεχνική βοήθεια, επικοινωνήστε με τον τοπικό σας διανομέα.

Οδηγίες χρήσης X7292B αναθεωρήθηκε Φεβρουάριος 2013
Εκτυπώθηκε στο Ηνωμ. Βασίλειο