

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of antibodies against Entamoeba histolytica in human serum or plasma



REF

DEENTG0140



96

1. INTRODUCTION

Entamoeba histolytica is an anaerobe parasite forming cysts which have four small nuclei and measure 10-15 µm in diameter. The cysts are sturdy and resist adverse environmental conditions. After ingestion by a susceptible host (invertebrates and vertebrates including humans), its wall is disrupted by the formation of a small opening through which an amoeba emerges. The amoeba divides serially through three cycles giving rise to eight uninucleate trophozoites from one cyst which are motile and measure 20-30 µm in diameter. Some of the trophozoites then invade the tissues of the large intestine and may erode them so extensively that they gain entrance into the bloodstream. Thus, amoebae can reach all parts of the body. Infection with Entamoeba histolytica has worldwide distribution. It is the causative agent of amoebiasis and amoebic dysentery and inhabits the lumen and mucosa of the large intestine, predominantly the transverse colon and cecum. Extra intestinal amoebiasis can afflict any organ or tissue. The majority of infected individuals are free of symptoms; this high incidence of asymptomatic carriers complicates matters. Those who are symptomatic experience a wide range of manifestations. Members of all age groups and both sexes are infected. The risk of infection increases with inadequate sanitary conditions. An increased prevalence of amoebiasis is found among people, who have an increased risk of exposure in the agricultural occupations and in male homosexuals.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
Entamoeba histolytica	Amoebiasis Dysentery Amoebic liver abscess, brain abscess Hepatic amoebiasis Carcinoma of the colon	Non specific diarrhoea ulcerative colitis abdominal cramps, bloody stools, dysentery	Transmission through faeces or contaminated food/water by oral ingestion of cysts. Sexual transmission among male homosexuals

Infection may be identified by

- Microscopy: stool examination: iron haematoxylin method, merthiolat iod formol concentration (MIFC)
- Serology: CF, CIE, ELISA

2. INTENDED USE

The Demeditec Entamoeba histolytica IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of antibodies against Entamoeba histolytica antigens in human serum or plasma (citrate). Especially asymptomatic carriers and cases of a previous non-invasive amoebiasis may be identified.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of antibodies against Entamoeba histolytica is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique. Especially asymptomatic carriers and cases of a previous non-invasive amoebiasis may be identified.

Microtiter strip wells are precoated with Entamoeba histolytica antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled Protein A Conjugate is added. This conjugate binds to the captured Entamoeba histolytica specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Entamoeba histolytica specific antibodies in the specimen. Acidic solution is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Entamoeba histolytica Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Entamoeba histolytica antigen; in resealable aluminium foil.
 - **IgG Sample Diluent***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
 - **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml acidic solution, 0.4 N/l; ready to use; red cap.
 - **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
 - **Entamoeba histolytica Protein A conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase Protein A; coloured blue, ready to use; black cap.
 - **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
 - **Entamoeba histolytica Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
 - **Entamoeba histolytica Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
 - **Entamoeba histolytica Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.
- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
** contains 0.2 % Bronidox L
*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25 °C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Entamoeba histolytica antigen. Store at 2...8 °C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Entamoeba histolytica Protein A Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with Protein A, horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. Protein A is an immunoglobulin Fc-binding protein with a molecular weight of 42,000 Daltons. The solution is ready to use. Store at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.5. Washing Solution (20x conc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. *The solution should be colourless or have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be discharged. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8 °C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.4 N acidic solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C. *After first opening stability until expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Do not heat inactivate the serum and avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying all samples should be diluted 1 + 100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1 + 100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1 well (e.g. A1) | for the substrate blank, |
| 1 well (e.g. B1) | for the negative control, |
| 2 wells (e.g. C1+D1) | for the cut-off control and |
| 1 well (e.g. E1) | for the positive control. |

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1 °C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl Entamoeba histolytica Protein A Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.

Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with IgG Sample Diluent and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.42 + absorbance value Cut-off control 0.44 = 0.86 / 2 = 0.43

Cut-off = 0.43

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$$

Example: $\frac{1.376 \times 10}{0.43} = 32 \text{ U (Units)}$

Cut-off:	10	U
Grey zone:	9-11	U
Negative:	<9	U
Positive:	>11	U

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	6	0.604	3.9
Intraassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	7	0.609	2.1

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is >95 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is >95 %.

10.4. Interferences

Interferences with lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin. Hemoglobin could show cross reactivity in negative sera.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1. EINLEITUNG

Entamoeba histolytica ist, als Erreger der Amöbenruhr (Amöbiasis), der wichtigste humanpathogene Vertreter der Rhizopoden. Morphologisch lassen sich drei Entwicklungsformen unterscheiden: die Minutaform, die Magnaform sowie Zysten.

Minutaformen leben parasitär auf der Schleimhaut des Darms und im Darmlumen und bilden die Zysten. Die Magnaformen sind mit 20-60µm große Gebilde, die auch als Gewebeformen bezeichnet werden, da sie in Gewebe eindringen und sich dort vermehren können. Zysten entstehen aus den Minutaformen. Sie enthalten ursprünglich einen Kern, durch isolierte Kernteilung entstehen zwei, später vier Kerne innerhalb der Zelle. Vierkernige Zysten sind infektiös.

Nach oraler Aufnahme infektiöser Zysten entwickeln sich im Dickdarm die Minutaformen, die im Darmlumen verbleiben, sich dort vermehren und mit dem Stuhl wieder ausgeschieden werden. Erst nach Umwandlung der Minuta- in die Magnaform kann der Erreger mittels proteolytischer Fermente in das Gewebe eindringen. Neben lokalen Gewebeschäden in der Darmwand können die Erreger so auch Anschluss an Blutgefäße finden und durch hämatogene Streuung auch andere Organe besiedeln. Durch die anatomischen Verhältnisse bedingt ist dabei hauptsächlich die Leber betroffen, jedoch können auch Milz, Gehirn, Haut u.a. befallen werden. Klinisch treten folgende Formen auf:

- die intestinale, invasive Form der Amöbiasis ist gekennzeichnet durch blutig-schleimige himbeer-geleartige Durchfälle (Invasion von Magnaformen in die Dickdarmschleimhaut), die infolge von Exsikkose und Elektrolytverschiebungen rasch bedrohliche Komplikationen verursachen können.
- Die intestinale, nichtinvasive Form verläuft in der Regel asymptomatisch und wird nur zufällig bei Stuhluntersuchungen diagnostiziert (Minutaformen und Zysten im Stuhl).
- Extraintestinale Formen, die bei etwa 30 % der Infektionen auftreten. Häufigste Komplikation ist die hämatogene Streuung der Amöben in die Leber. Dort entwickeln sich Gewebenekrosen, die als so genannte Leberabszesse dominieren. Unbehandelt sind sie mit hoher Letalität behaftet.

Infektionen mit Entamoeba histolytica sind weltweit verbreitet. In den Tropen und Subtropen treten die meisten Manifestationen auf. Trägerquoten von 70% der jeweiligen Bevölkerung sind möglich. In Mitteleuropa und Nordamerika beträgt die Rate ca. 1%. Weltweit muss mit jährlich etwa 450 Millionen Darminfektionen durch Entamoeba histolytica gerechnet werden. Die Zahl der Todesfälle wird von der WHO mit mindestens 40 000 pro Jahr angegeben. Der Mensch ist das einzige Erregerreservoir. Zysten werden mit dem Stuhl ausgeschieden und sind außerhalb des Menschen bis zu zehn Tage infektiös. Typische Infektionsquellen sind Trinkwasser, rohes Gemüse und ungeschältes Obst.

Spezies	Übertragungsweg	Symptome	Komplikationen	Diagnostik
Entamoeba histolytica	Fäkal-oral, Wasser, Nahrungsmittel	Bei >90% keine (nichtinvasive, intestinale Form) Dysenterie, Diarrhö, Sepsis	Darmblutung, Darmwandamöbom, Leberabszess, Peritonitis	Mikroskopie Serologie bildgebende Verfahren (Sonographie, CT)

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- Mikroskopie: Nachweis von Zysten oder Magnaformen im Stuhl-Direktpräparat oder nach MIF (Merthiolat-Iod-Formol)-Anreicherung
- Serologie: Nachweis von spezifischen Antikörpern mittels KBR, indirekte Hämagglutination, ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der Demeditec Entamoeba histolytica IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper gegen Entamoeba histolytica in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von gegen Entamoeba histolytica gerichteten Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Entamoeba histolytica Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. HRP-konjugiertes Protein A bindet an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstanden Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit saurer Lösung führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Entamoeba histolytica beschichtete Mikrotiterstreifen:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Entamoeba histolytica Antigen.
 - **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
 - **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml saure Lösung, 0.4 N/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
 - **Waschpuffer (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
 - **Entamoeba histolytica Protein A Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugiertem Protein A; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
 - **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
 - **Entamoeba histolytica Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **Entamoeba histolytica Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
 - **Entamoeba histolytica Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- * enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung
** enthält 0.2 % Bronidox L
*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Entamoeba histolytica Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8 °C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Entamoeba histolytica Protein A Konjugat

Das Fläschchen enthält 20 ml einer Lösung von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Protein A, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Protein A ist ein an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 42,000 Daltons. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8 °C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8 °C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8 °C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8 °C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8 °C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8 °C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,4 N saure Lösung (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8 °C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*
Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschritte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 1 Vertiefung (z.B. A1) | für den Substratleerwert (Blank), |
| 1 Vertiefung (z.B. B1) | für die Negativ Kontrolle und |
| 2 Vertiefungen (z.B. C1+D1) | für die Cut-off Kontrolle und |
| 1 Vertiefung (z.B. E1) | für die Positiv Kontrolle vorsehen. |

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden. Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier aufschlagen um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 100µl Entamoeba histolytica Protein A Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) **in A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

*Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.*

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0.45 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.41 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.86 : 2 = \underline{0.43}$

Cut-off = 0.43

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen.

Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in Einheiten [U]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{Einheiten} = \text{U}]$

Beispiel: $\frac{1.376 \times 10}{0.43} = 32 \text{ U (Units)}$

Cut-Off:	10	U
Grauzone:	9-11	U
Negativ:	<9	U
Positiv:	>11	U

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	6	0,604	3,9
Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	7	0,609	2,1

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >95 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist >95 %.

10.4. Interferenzen

Lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA. Bei Hämoglobin könnte eine kreuzreagierende Eigenschaft mit Entamoeba neg. Seren auftreten.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Patterson, M. et al. Serologic Testing of Amebiasis. Gastroenterology. 78:136, 1980

Healy, G. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. Bull NY Acad Med. 47:478, 1971

Healy, G. Immunologic Tools in the Diagnosis of Amebiasis: Epidemiology in the United States. Rev Infect Diseases. Vol.8, 2:228, 1986

Walsh, J. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. Rev Infect Diseases. Vol.8, 2:228, 1986

SCHEME OF THE ASSAY






Entamoeba histolytica IgG-ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
DIL G	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests