

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner invasive Amöbiasis

96 Tests in einzelnen Wells für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz



Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. 9550
EC reg. N°: CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Anwendungsgebiet:

Der Bordier *Entamoeba histolytica* IgG ELISA-Kit ist zum quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Entamoeba histolytica* in humanem Serum bestimmt. Serologie ist eine Diagnosehilfe und kann nicht als alleinstehende Methode zur Diagnosestellung verwendet werden.

Hintergrund-Informationen:

Amöbiasis wird von einer pathogenen Amöbenart, der *Entamoeba histolytica*, verursacht. Die Ansteckung des Menschen kann durch das versehentliche Verschlucken von Amöbenzysten aus kontaminiertem Wasser oder Essen erfolgen. Während des intestinalen Stadiums kommt es zu deutlich ausgeprägten Symptomen (Durchfall und Bauchschmerzen). In einigen Fällen kommt es zu einer extraintestinalen Ausbreitung des Parasiten, dadurch können sich in der Leber infizierte Abszesse bilden. Die Patienten klagen hauptsächlich über Fieber und Bauchschmerzen. Die Diagnosestellung erfolgt anhand von CT- oder MRT-Bildern und Ultraschalluntersuchungen zum Nachweis von Leberläsionen und einem positiven serologischen Testergebnis. Der serologische Test kann im Rahmen der Differenzialdiagnose einer Lebererkrankung zum Ausschluss von Amöbiasis verwendet werden.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das komplette benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er brechbaren Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Entamoeba histolytica* löslichem Trophozoiten-Antigen beschichtet sind. Spezifische Antikörper werden sich an das Antigen anheften, wobei unspezifische Bestandteile durch Abwaschen entfernt werden können. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Beim wiederholten Abwaschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt mit pNPP-Substrat, der bei Kontakt mit alkalischer Phosphatase gelb wird. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge von spezifischen *Entamoeba histolytica*-Antikörpern in der Probe. Die Reaktion wird mit Dikaliumhydrogenphosphat unterbrochen. Zum Auslesen der Absorbanz bei 405 nm wird ein ELISA-Microplattenleser verwendet.

Eine Automatisierung des Tests ist möglich, muss aber vom Anwender validiert werden.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9550-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Entamoeba histolytica</i> löslichen Trophozoiten Antigenen	96	wells
DILB	9550-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat, violette Färbung	50	ml
WASH	9550-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9550-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9550-05	Stopp Lösung (0,5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Negatives Kontroll-Serum (20 x), grüne Verschlusskappe	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum (20 x), gelbe Verschlusskappe	200	µl
CONTROL +	9550-08	Positives Kontroll-Serum (20 x), rote Verschlusskappe	200	µl
CONJ	9550-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat (50 x), violette Verschlusskappe	300	µl
SUBS	9550-10	Phosphatase Substrat (para-Nitrophenylphosphat)	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung des Kits bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Die Komponenten sollten direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt werden. Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Das Verfallsdatum nach dem Öffnen der Reagenzien ist bei einer Lagertemperatur von 2-8°C gültig.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und µl). Messzylinder. Röhrchen zur Probenverdünnung. Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken. Destilliertes Wasser. Inkubator 37°C. ELISA Reader mit Filter: 405 nm. Manuelle oder automatische Ausrüstung zum Spülen der Wells. Vortexmischer. Stoppuhr.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Alle Reagenzien vor der Anwendung auf Raumtemperatur bringen und gut vermischen.

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9550-01) entnehmen (einen Teststreifen für die Blindprobe und drei Teststreifen für die Kontrollen plus die Anzahl der Proben). Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder-verschliessbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9550-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Dies wird für die Verdünnung von Kontroll-Serum, Proben und Konjugaten verwendet. Der Verdünnungspuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9550-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Kontroll-Serum: Je 10µl der Kontrollseren 9550-06 bis -08 mit 190 µl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt). Das verdünnte Kontrollserum ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Konjugat: Das Konzentrat 9550-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:50 verdünnt. Die Verdünnung des Konjugats muss am Tag der Probeentnahme stattfinden. Verdünntes Konjugat nicht lagern.

Substrat-Lösung: Die Substrattabletten 9550-10 in unverdünntem Enzympuffer 9550-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen. Substrat am Tag der Probeentnahme verdünnen und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Tabletten und Substratlösungen sollten eine leicht gelbliche oder keine Färbung aufweisen. Tabletten und Substrate mit einer gelben Färbung sollten aufgrund möglicher Hydrolyse entsorgt werden. Substratlösung nicht lagern.

Stopp-Lösung: Reagenz 9550-05 gebrauchsfertig.

Probenvorbereitung und -Lagerung:

Humanes Serum verwenden. Serum, das innerhalb von wenigen Tagen untersucht werden soll, sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Anderenfalls sollte es bei -20°C oder tiefer eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Probenmaterial mischen und 1:201 in Verdünnungspuffer Lösung auflösen (z.B. 5 µl Probe in 1,0 ml).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

Die Mengen der giftigen Substanzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Komponente	Referenz	Natriumazid (NaN ₃)	Thiomersal
Verdünnungspuffer (10 x)	9550-02	0,1%	0,02%
Waschpuffer (10 x)	9550-03	0,05%	/
Enzympuffer	9550-04	0,01%	/
Kontrollserum (20 x)	9550-06 zu -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9550-09	0,1%	/

Natriumazid und Thiomersal in den angegebenen Konzentrationen sind bei Haut- oder Schleimhautkontakt nicht giftig.

- Die Stopp-Lösung 9550-05 (0,5 M K₃PO₄) ist reizend.
- Die Kontrollseren (9550-06 bis -08) wurden aus Kaninchen gewonnen.
- Alle Reagenzien und Proben sollten als potenziell ansteckendes Material behandelt werden.
- Reagenzien zwischen einzelnen Einheiten und Bordier ELISA-Kits nicht austauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht zusammen mit den Reagenzien aus diesem Kit verwenden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht verwenden.
- Reagenzflaschen unmittelbar nach Gebrauch dicht verschliessen. Flaschendeckel dürfen nicht vertauscht werden, um gegenseitige Kontamination zu vermeiden.
- Separate und saubere Pipettenspitzen für jede Patientenprobe verwenden.
- Mikrowells nur einmal verwenden.
- Vermeiden Sie eine Beschädigung der Mikrovertiefungen durch mechanische Einwirkungen (Kegel, Düsen).
- Die Beschreibungen der auf den Etiketten verwendeten Symbole finden Sie auf der Website www.bordier.ch.

Entsorgung:

Die in diesem Test verwendeten Materialien gelten als gefährliche Abfälle. Entsorgung gefährlicher Abfälle muss entsprechend den nationalen und regionalen Rechtsvorschriften stattfinden.

Durchführung:

Blasenbildung während des Nachweisverfahrens vermeiden.

Schritt 1: Blocking:

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (serumfreier Blank).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren. Für Nachweisverfahren mit mehr als 25 Proben wird eine Duplikaterstellung mit den drei verbleibenden Wells empfohlen.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren (einschliesslich serumfreier Blankwert).

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden, falls notwendig, abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe der Stopp-Lösung messen.

Ergebnis-Auswertung:

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1,200
- A der schwach positiven Kontrolle > 12% der A der positiven Kontrolle
- A der negativen Kontrolle < 12% der A der positiven Kontrolle
- A des serumfreien Blanks < 0,350

Qualitätskontrollen aktueller Testeinheiten sind auf unserer Internetseite zu finden: www.bordier.ch.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9550-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit invasive Amöbiasis und von gesunden Patienten unterschieden werden kann. Die Cutoff-Index einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Entamoeba histolytica*-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Entamoeba histolytica*-Antigen als signifikant angesehen. Es zeigt, dass der Patient Kontakt mit dem Parasiten hatte.

Die Unsicherheitsbereich sollte von jedem Labor ausgehend von der Patientenpopulation einzeln definiert werden. Bei Ergebnissen im Unsicherheitsbereich wird eine Wiederholung des Tests mit einer neuen Probe nach 2 bis 4 Wochen empfohlen.

Bei positiven oder unklaren Ergebnissen empfehlen wir die Durchführung eines Bestätigungstests (meist durch Western Blot), sofern ein solcher Test verfügbar oder aufgrund nationaler Vorschriften erforderlich ist.

Analytische Leistungen:

Analytische Spezifität:

Eine Spezifität von 80% wurde bei einer Gruppe von 40 Seren von Patienten mit anderen Parasiteninfektionen ermittelt. Kreuzreaktivität tritt vor allem bei Patienten mit Leishmaniose, Malaria, Filariosen und Strongyloidiasis auf. Es wurden keine positiven oder negativen Interferenzen mit supraphysiologischen Konzentrationen von Hämoglobin, Lipiden oder Bilirubin in Seren beobachtet, die mit Interferenzen ergänzt wurden.

Erläuterung:

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0,612	2,394	0,649	2,449
Standardabweichung (A Wert)	0,040	0,162	0,041	0,162
Variationskoeffizient (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Die folgenden Leistungen können nicht bewertet werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial für diese Analyse vorliegt:

- Analytische Empfindlichkeit (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen)
- Genauigkeit
- Richtigkeit
- Messbereich
- Linearität

Klinische Leistungen:

Diagnostische Sensitivität:

Eine Sensitivität von 100% wurde bei einer Gruppe von 52 Seren von Patienten mit invasiver Amöbiasis ermittelt.

Diagnostische Spezifität:

Eine Spezifität von 96% wurde bei einer Gruppe von 99 Seren von (Schweizer) Blutspendern ermittelt. Eine Spezifität von 89% wurde bei einer Gruppe von 71 Seren von Patienten mit Verdacht auf Amöbiasis, bei denen diese Erkrankung jedoch sicher ausgeschlossen werden konnte, ermittelt.

Positiver (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV):

Für die obengenannten Populationen wurde ein PPV von 81% und ein NPV von 100% ermittelt.

Erwartete Werte in normalen und betroffenen Populationen:

In einer Normalpopulation mit 71 Seren von Patienten mit Verdacht auf Amöbiasis, bei denen diese Erkrankung jedoch sicher ausgeschlossen werden konnte, beträgt der erwartete Indexwert 0,57. In einer betroffenen Population mit 52 Seren von Patienten mit invasiver Amöbiasis beträgt der erwartete Indexwert 5,43.

Zwischenfälle:

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

Grenzen:

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand von Ergebnissen eines einzelnen Tests erfolgen. Die vollständige Diagnosestellung sollte unter Berücksichtigung der endemischen Situation, Krankengeschichte und Symptomatik sowie unter Verwendung von bildgebenden Verfahren sowie serologischen Daten stattfinden.

Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten haben die serologischen Daten eine beschränkte Aussagekraft.

Referenzen:

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

