



Instructions for Use



Entamoeba histolytica **IgG ELISA**

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



EIA-3830



96 wells



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG International, Inc.
USA
Telephone: (908) 233-2079
Fax: (908) 233-0758
E-Mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTRODUCTION.....	2
2	INTENDED USE	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
4	MATERIALS.....	3
5	STABILITY AND STORAGE	3
6	REAGENT PREPARATION.....	4
7	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	RESULTS.....	6
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	6
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	7
12	PRECAUTIONS AND WARNINGS.....	7
1	EINLEITUNG.....	8
2	VERWENDUNGSZWECK	8
3	TESTPRINZIP	8
4	MATERIALIEN	9
5	STABILITÄT UND LAGERUNG	9
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	10
7	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	10
8	TESTDURCHFÜHRUNG.....	11
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
10	TESTMERKMALE.....	12
11	GRENZEN DES VERFAHRENS	13
12	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	13
1	INTRODUZIONE.....	14
2	USO PREVISTO	14
3	PRINCIPIO DEL TEST.....	14
4	MATERIALI	15
5	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE.....	15
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI	16
7	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	16
8	PROCEDIMENTO.....	17
9	RISULTATI.....	18
10	CARATTERISTICHE DEL TEST	18
11	LIMITAZIONI	19
12	PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....	19
	SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS.....	20

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 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. Sulphuric acid 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 sulphuric acid, 0.2 mol/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 °C - 8 °C.

6 REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20 °C - 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 °C - 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 °C - 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 °C - 8 °C.

After first opening stability until expiry date when stored at 2 °C - 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 °C - 8 °C.

After first opening stability until expiry date when stored at 2 °C - 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 °C - 8 °C.

After first opening stability until expiry date when stored at 2 °C - 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 °C - 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 °C - 8 °C.

6.7 Stop Solution

The bottle contains 15 mL 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2 °C - 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 °C - 8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 °C 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 300 µL to 350 µL 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 °C ± 1°C.

1. Dispense 100 µL 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 °C ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL 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 100 µL TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100 µL 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 DU 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; 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 DRG Units

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

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

Cut-Off:	10	DU
Grey zone:	9-11	DU
Negative:	<9	DU
Positive:	>11	DU

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Precision

Inter-assay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	6	0.604	3.9
Intra-assay	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 20-60 µm 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 infektionsfähig.

Nach oraler Aufnahme infektionsfähiger 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 himbeergeleeartige 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 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 immunenzymatische 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 Schwefelsäure 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 Schwefelsäure, 0.2 mol/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 Waschanlage
- 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 °C - 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 °C - 25 °C) zu bringen!

6.1 Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Entamoeba histolytica Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2 °C - 8 °C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 °C - 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 °C - 8 °C).

6.3 Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2 °C - 8 °C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon.

Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2 °C - 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 °C - 8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt.

Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2 °C - 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 °C - 8 °C).

6.6 TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 mL eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2 °C - 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 °C - 8 °C.

6.7 Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 mL 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2 °C - 8 °C aufzubewahren.

Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2 °C - 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 °C - 8 °C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70 °C bis -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 Negativkontrolle und |
| 2 Vertiefungen | (z.B. C1+D1) | für die Cut-Off-Kontrolle und |
| 1 Vertiefung | (z.B. E1) | für die Positivkontrolle 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 °C ± 1°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 300 µL 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. 100 µL 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 °C - 25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100 µL 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 DU 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: Extinktionwerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionwerte > **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: $0.45 \text{ OD Cut-Off-Kontrolle} + 0.41 \text{ OD Cut-Off-Kontrolle} = 0.86; 0.86 : 2 = \underline{0.43}$

$$\text{Cut-Off} = \underline{0.43}$$

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 DRG-Einheiten [DU]

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

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

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

10 TESTMERKMALE

10.1 Präzision

<u>Inter-assay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>
Pos. Serum	6	0,604	3,9
<u>Intra-assay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>
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.

1 INTRODUZIONE

L'Entamoeba histolytica, agente eziologico dell'amebiasi, è l'unica ameba patogena per l'uomo. Si presenta in natura sotto forma di cisti infettanti e di trofozoiti (forme vitali potenzialmente patogene). L'ameba può comportarsi come commensale, cioè convivere con l'organismo parassitato senza provocare segni o sintomi di malattia, oppure invadere i tessuti dando luogo ad infezioni intestinali o extra-intestinali. Molte infezioni sono quindi asintomatiche, ma possono rendersi evidenti in seguito a particolari circostanze, quali malattie intercorrenti o stati di immunodepressione. La trasmissione avviene soprattutto in seguito all'ingestione di acqua o di alimenti (soprattutto frutta e verdura) contaminati da materiale fecale in cui siano presenti cisti amebiche. L'uomo, malato o asintomatico, è l'unica sorgente di infezione. Le cisti possono rimanere vitali per tre mesi ma possono essere distrutti con iperclorazione o iodazione. Generalmente, il periodo d'incubazione è di due quattro settimane ma può anche protrarsi per mesi o anni. Circa il 10% degli infetti manifesta sintomi clinici. La maggior parte sviluppa colite amebica, con diarrea e dolori addominali. Le forme viscerali (il circa 30% delle infezioni), per lo più localizzate a livello del fegato, costituiscono vere e proprie emergenze mediche. Le caratteristiche cliniche corrispondono a quelle di un ascesso profondo, con febbre e dolori.

L'Entamoeba histolytica, è diffusa in tutto il mondo e si stima che il 12% della popolazione mondiale ne sia infettata. La prevalenza dell'infezione è variabile: 1% nei paesi industrializzati, tra il 50 e l'80% nei paesi tropicali. Provoca la morte di 40000 persone circa all'anno nel mondo intero.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
Entamoeba histolytica	Amebiasi	Il 90% delle infezioni sono asintomatiche. febbre e dolori	Trasmissione: orale; contatto con feci, acqua o cibo contaminato

Diagnosi

- Microscopia: cisti nelle feci
- Sierologia: ELISA, immunofluorescenza indiretta IFA, test di fissazione del complemento, agglutinazione

2 USO PREVISTO

Il Entamoeba histolytica IgG ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per Entamoeba histolytica nel siero o plasma (citrato) umano.

3 PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgG per Entamoeba histolytica si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici dell'Entamoeba histolytica. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgG umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per l'Entamoeba histolytica di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4 MATERIALI

4.1 Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni dell'Entamoeba histolytica (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigeni dell'Entamoeba histolytica; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG** 1 flacone contenente 100 mL di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2 ; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0.2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):*** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2 ; tappo bianco.
- **Coniugato Entamoeba histolytica Proteina A**:** 1 flacone contenente 20 mL di Proteina A, coniugata a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Entamoeba histolytica IgG Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 mL; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Entamoeba histolytica IgG Controllo Cut-Off***:** 1 flacone da 3 mL; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Entamoeba histolytica IgG Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 mL; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3 Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37 °C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µL)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) prima dell'uso!

6.1 Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati dell'*Entamoeba histolytica*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.*

6.2 Coniugato *Entamoeba histolytica* Proteina A

Il flacone contiene 20 mL di anticorpi anti-IgG umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro.

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

6.3 Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon.

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

6.4 Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 mL di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni .

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

6.5 Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 mL di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37 °C prima di diluire.*

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

6.6 Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata.*

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

6.7 Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 mL di acido solforico, 0.2 mol/L (R36/38, S26), pronto all'uso.

Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2 °C - 8 °C.

7 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrato) umano.

Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70 °C a -20 °C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1 Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni **1 + 100** con tampone diluente IgG.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di tampone e mescolare bene (Vortex).

8 PROCEDIMENTO

8.1 Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µL per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-Off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a 37 °C ± 1 °C

1. Pipettare 100 µL di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37 °C ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.
Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.
5. Pipettare 100 µL di Coniugato Entamoeba histolytica Proteina A in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Non esporre a fonti di luce diretta.**
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) al buio.**
10. Pipettare 100 µL di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgG. Il risultato DU viene moltiplicato per due.
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2 Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9 RISULTATI

9.1 Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e < Cut-Off**
- **Controllo Cut-Off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza > **Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2 Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-Off.

*Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-Off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-Off 0.37 =0.76;
0.76/ 2= 0.38*

Cut-Off = 0.38

9.3 Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1 Risultati in unità DRG [DU]

$$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{unità DRG} = \text{DU}]$$

Esempio: $\frac{1.376 \times 10}{0.43} = 32 \text{ DU (DRG Units)}$

Cut-Off : 10 DU
 Dubbio: 9-11 DU
 Negativo: <9 DU
 Positivo: >11 DU

10 CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1 Precisione

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Siero pos.	6	0,604	3,9
Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Siero pos.	7	0,609	2,1

10.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a >95 %.

10.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >95 %.

10.4 Possibili interferenze

Interferenze con sieri lipidici o itterici non sono stati osservati fino ad una concentrazione di 5 mg/mL per i trigliceridi e fino a 0,2 mg/mL di bilirubina. L'emoglobina può dare cross-reattività con sieri negativi all'entameba.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11 LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.

I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.











ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1 Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità
MTP	Microplate	Mikrotiterplatte	Microplaque	Microplaca	Micropiastra
CONJ	Conjugate	Konjugat	Conjugué	Conjugado	Coniugato
CAL	Calibrator resp. Standard	Kalibrator bzw. Standard	Calibrateur resp Etalon	Calibrador o bien Estándar	Calibratore ossia Standard
Control	Control	Kontrolle			Controllo
Control ADD	Additional Control	Zusatzkontrolle		Additional Control	Controllo
DIL G	Sample diluent buffer IgG	IgG-Probenverdünnungspuffer	Tampon diluant pour échantillon IgG	soluzione solución tampón para muestras IgG	tampone per i campioni IgG
SOLN STOP	Stop solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Substrat TMB	solción substrato TMB	soluzione substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated	Waschlösung 20x konzentriert	Solution de lavage concentré 20 x	solución de lavado concentrado x20	soluzione di lavaggio concentrazione x20