

RIDASCREEN® Entamoeba

REF C1701



1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Entamoeba ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba dispar* in humanen Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Weltweit infiziert *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* jährlich bis zu 500 Millionen Menschen. Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass die mit herkömmlichen diagnostischen Methoden identifizierten Protozoen mit der Bezeichnung *Entamoeba histolytica* aus zwei, morphologisch nicht unterscheidbaren Spezies bestehen, der pathogenen Spezies *Entamoeba histolytica* und der nach heutigem Wissensstand apathogenen Spezies *Entamoeba dispar*.

Die klinischen Symptome einer Amöbiasis werden durch die Invasion des Parasiten aus dem Darmlumen in die Schleimhaut des Kolons ausgelöst. Hierbei findet man häufig Trophozoiten mit phagozytierten Erythrozyten. Diese Trophozoiten werden wegen ihrer Größe als Magna-Form bezeichnet. Folgen der Invasion in die Darmmukosa sind Durchfall, Dysenterie oder gar Amöbome. Als Komplikation können nach disseminierter Streuung Leberabszesse, Lungenabszesse oder in sehr seltenen Fällen sogar Hirnabszesse entstehen, welche unbehandelt meist einen tödlich endenden Verlauf nehmen.

Die klinischen Symptome der akuten intestinalen Form der Amöbiasis sind krampfartige Bauchschmerzen mit Übelkeit und starken Durchfällen mit blutigen und schleimigen Stühlen. Das akute Stadium kann in ein chronisches Stadium mit gelegentlichem Durchfall im Wechsel mit Obstipation, Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen übergehen. Es wurden auch völlig symptomlose Zystenausscheider beschrieben.

Einen großen Vorteil gegenüber der Mikroskopie zum direkten Erregernachweis bieten sensitive immunologische Testverfahren wie der RIDASCREEN® ELISA mit spezifischen Antikörpern gegen Adhäsine, ein spezifisches Oberflächenprotein von *Entamoeba*, welches spezifisch an Galaktose oder N-Acetyl-Galaktosamin der Enterozyten des Wirts bindet und anschließend durch Zytolyse dieser Zellen die Invasion des Erregers ermöglicht.

In etwa 10 % der Fälle einer akuten Amöbendysenterie kommt es zu extraintestinalen Komplikationen wie Leberabszessen oder Befall sonstiger Organe. Bei extraintestinaler Amöbiasis ist ein serologischer Nachweis von Antikörpern angezeigt.

Hierdurch wird die Diagnostik unabhängig von einer subjektiven Beurteilung und sensitiver durch die Erfassung auch von morphologisch nicht mehr identifizierbaren Bestandteilen. Da Antikörpertiter meist gleichzeitig mit Beginn der klinischen Symptomatik nachweisbar sind, kann zur Identifikation von *E. histolytica* ein spezifischer Antikörper-Nachweis angeschlossen werden. Dieser bietet zudem die

Möglichkeit über die Höhe des Titers zwischen intestinaler und extraintestinaler Amöbiasis zu differenzieren, was für die Therapiewahl von Bedeutung ist.

3. Testprinzip

Im RIDASCREEN® Entamoeba-Test werden spezifische Antikörper in einem Sandwich-Verfahren eingesetzt. An der Oberfläche der Vertiefung der Mikrotiterplatte sind Entamoeba-spezifische Antikörper gegen Antigene von *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* gebunden. Eine Suspension der zu untersuchenden Stuhlprobe sowie die Kontrollen werden zusammen mit biotinylierten Anti-Entamoeba-Antikörpern (Konjugat 1) bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) zur Inkubation in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat (Konjugat 2) dazu gegeben und erneut bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Bei Anwesenheit von Entamoeba-Antigenen bildet sich ein Sandwich-Komplex aus dem immobilisierten Antikörper, dem Entamoeba-Antigen und dem konjugierten Antikörper. Nicht gebundenes Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugat wird in einem weiteren Waschschrift entfernt. Nach der Zugabe von Substrat wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration des in der Probe vorhandenen Entamoeba-Antigens.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i>
Diluent 1	100 ml	Probenverdünnungspuffer 1, Protein-gepufferte NaCl-Lösung; gebrauchsfertig; blau gefärbt
Wash buffer	100 ml	Waschpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (10-fach konz.); enthält 0,1 % Thimerosal
Control +	2 ml	Positivkontrolle; Inaktiviertes Entamoeba-Antigen; gebrauchsfertig; rot-rosa gefärbt
Control -	2 ml	Negativkontrolle; negative Kontrolle (Probenverdünnungspuffer 1); gebrauchsfertig
Conjugate 1	13 ml	Biotin-konjugierte monoklonale Antikörper (Maus) gegen Entamoeba-Antigene in stabilisierter Proteinlösung; gebrauchsfertig; grün gefärbt
Conjugate 2	13 ml	Streptavidin-Poly-Peroxidase Konjugat in stabilisierter Proteinlösung gebrauchsfertig; orange gefärbt
Substrate	13 ml	Wasserstoffperoxid/TMB; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz; 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfalldatum verwendungsfähig. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C 4 Wochen haltbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1 Benötigte Reagenzien

Folgende Reagenzien werden für die Durchführung des RIDASCREEN® Entamoeba Tests benötigt:

Reagenzien
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2 Benötigtes Laborzubehör

Folgendes Zubehör wird für die Durchführung des RIDASCREEN® Entamoeba Tests benötigt:

Zubehör
Probenröhrchen
Einwegpipetten (Art. Nr.:Z0001)
Vortex Mixer (optional, siehe 9.3.)
Mikropipette für 50 - 100 µl und 1 ml Volumina
Messzylinder (1000 ml)
Stoppuhr
Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 - 650 nm)
Filterpapier (Labortücher)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) auf www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindliche Positivkontrolle enthält inaktiviertes Entamoeba-Antigen. Sie sollte, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den nationalen Sicherheitsbestimmungen behandelt werden.

Der Waschpuffer enthält als Konservierungsmittel 0,1 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Das Untersuchungsmaterial ist bis zur Verarbeitung bei 2 – 8 °C zu lagern. Kann das Material nicht innerhalb von 3 Tagen im Test eingesetzt werden, wird eine Lagerung bei –20 °C oder kälter empfohlen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Probe ist zu vermeiden. **Eine im Probenverdünnungspuffer 1:11 verdünnte Stuhlprobe ist bei 2 - 8 °C bis zu 7 Tagen haltbar (Tab. 1).**

Stuhlproben oder Rektalabstriche sollten nicht in Transportbehältern gesammelt werden, die Transportmedien mit Konservierungsstoffen, tierischen Seren, Metall-Ionen, oxidierenden Agenzien oder Detergenzien enthalten, da Interferenzen mit dem RIDASCREEN® Entamoeba Test auftreten können.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

Tab. 1: Probenlagerung

Unverdünnte Stuhlprobe		Verdünnte Stuhlprobe
2 - 8 °C	≤ - 20 °C	2 - 8°C
≤ 3 Tage	> 3 Tage	≤ 7 Tage

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterplatte **Plate** auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch sind die Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Beutel) und die Reagenzien wieder bei 2 - 8 °C zu lagern. Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Ein direkter Kontakt von Proben mit den Kitkomponenten ist zur Vermeidung von Kreuzkontamination zu vermeiden.

Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung sollte vermieden werden. Es wird empfohlen, die Mikrotiterplatte zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten abzudecken oder abzukleben.

9.2 Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **Wash buffer** wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

9.3 Vorbereitung der Proben

In ein gekennzeichnetes Teströhrchen wird 1 ml RIDASCREEN® Probenverdünnungspuffer **Diluent | 1** vorgelegt. Flüssiger Stuhl wird in eine Einwegpipette (Art. Nr. Z0001) bis kurz oberhalb der zweiten Markierung aufgesaugt (ca. 100 µl) und im vorgelegten Puffer suspendiert. Bei festem Stuhl wird eine äquivalente Menge Stuhl (ca. 50-100 mg) mit einem Spatel oder einer Einwegimpföse entnommen und suspendiert.

Das Homogenisieren der Stuhlsuspension erfolgt entweder durch Aufsaugen und Ausstoßen mit der Einwegpipette oder alternativ durch Mischen auf einem Vortex Mixer. Nach kurzem Stehenlassen (10 min) zur Sedimentation grober Stuhlpartikel kann der auf diese Weise geklärte Überstand der Stuhlsuspension direkt im Test eingesetzt werden. Erfolgt die Testdurchführung in einem ELISA-Automaten muss dieser Überstand partikelfrei sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine Zentrifugation bei 2500 g für 5 Minuten.

Hinweis: Die im **Diluent | 1 verdünnten Stuhlproben können auch in allen anderen RIDASCREEN® ELISA eingesetzt werden die ebenfalls das **Diluent | 1** verwenden.**

9.4 Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen erfolgt die Zugabe von 100 µl der Positivkontrolle **Control | +**, der Negativkontrolle **Control | -** oder der Stuhlprobensuspension in die Vertiefungen. Anschließend werden 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers **Conjugate | 1** zugegeben und nach Durchmischung (leichtes Tippen an den Plattenrand) für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.5 Waschen

Sorgfältiges Waschen ist wichtig zur Erzielung korrekter Ergebnisse und sollte daher strikt nach Anleitung erfolgen. Das Inkubat in den Kavitäten sollte zunächst in einen Abfallbehälter entleert und gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgt werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5-Mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer **Wash buffer** gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer noch trockenen und unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen. Bei der Verwendung von Waschautomaten oder ELISA-Vollautomaten ist die korrekte Einstellung des Gerätes zu beachten bzw. beim Hersteller zu erfragen.

Geräte, die R-Biopharm liefert, sind bereits mit validierten Einstellungen und Arbeitsprotokollen programmiert.

Um Verstopfungen von Waschnadeln zu vermeiden sollten gemäß der Probenvorbereitung (Punkt 9.3.) nur partikelfreie Stuhlsuspensionen eingesetzt werden. Bei den Waschschrritten muss auf ein komplettes Absaugen der Flüssigkeit geachtet werden.

9.6 Zweite Inkubation

100 µl des Streptavidin-Poly-Peroxidase-Konjugates **Conjugate | 2** werden in die Kavitäten pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

9.7 Waschen

Waschen gemäß Punkt 9.5.

9.8 Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl Substrat **Substrate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei **450 nm und 620 nm Referenzwellenlänge gemessen**.

Hinweis: Hoch positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Substrates verursachen.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um Reagenzienstabilität und korrekte Testdurchführung sicherzustellen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (OD) der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,2 (kleiner 0,160 bei 450/620 nm) und der gemessene Wert der Positivkontrolle bei 450 nm oder bei 450/620 nm größer 0,8 ist. Ist der Wert der Negativkontrolle größer 0,2 (0,160) kann dies ein Zeichen für ungenügendes Waschen sein. Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich verfärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributor.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Grenzwertes

Zur Festlegung des Grenzwertes werden zu der gemessenen Extinktion der Negativkontrolle 0,15 Extinktionseinheiten hinzuaddiert.

$$\text{Cut-off} = \text{Extinktionswert der Negativkontrolle} + 0,15$$

11.2. Testergebnis

Als positiv werden solche Proben beurteilt, deren Extinktionswert mehr als 10 % über dem errechneten Grenzwert liegt.

Als grenzwertig und zu wiederholen werden solche Proben bezeichnet, deren Extinktionswert im Bereich von 10 % oberhalb und unterhalb des Grenzwertes liegt. Fällt eine Wiederholungsuntersuchung mit einer frischen Stuhlprobe wieder in den Graubereich, so ist die Probe als negativ zu beurteilen.

Proben, die mehr als 10 % unter dem errechneten Grenzwert liegen, sind als negativ zu bewerten.

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Entamoeba-Test weist Antigen von *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* nach. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe eines ermittelten Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem vollständigen klinischen Bild zu interpretieren.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein negatives Ergebnis schließt eine mögliche Amöbiasis nicht aus. Es kann durch intermittierende Ausscheidung des Erreger oder zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit *Entamoeba histolytica*, sollte eine weitere Stuhlprobe untersucht werden. Bei Verdacht auf eine extraintestinale Amöbiasis kann diese durch den Nachweis

spezifischer Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* im Serum bestätigt werden (RIDASCREEN® E. histolytica IgG, Art. No.: K1721).

Ein grenzwertiges Ergebnis kann durch eine inhomogene Verteilung des Antigens in der Stuhlprobe verursacht werden. Deshalb sollte in einem solchen Fall eine zweite Suspension aus der gleichen Probe untersucht werden oder eine weitere Stuhlprobe zur Untersuchung angefordert werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität des RIDASCREEN® Entamoeba ELISA wurde eine lineare Verdünnungsreihe einer Probe mit einer bekannten Anzahl an Entamoeba-Zysten hergestellt und in Triplikaten vermessen. Der LoD ist die Konzentration, die zuletzt in allen Replikaten positiv bewertet wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Ergebnisse der Analytischen Sensitivität für *Entamoeba histolytica* des RIDASCREEN® Entamoeba ELISA

	E. histolytica		E. dispar	
	MW [OD 450/620]	Zysten / Reaktionsansatz	MW [OD 450/620]	Zysten / Reaktionsansatz
LoD	0,173	17	0,200	595

13.2 Mitbewerbervergleich

Es wurden vorbefundete Stuhlproben (10 Entamoeba-positive und 30 Entamoeba-negative) mit dem RIDASCREEN® Entamoeba-Test untersucht und mit einem Konkurrenz-ELISA verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Vergleich des RIDASCREEN® Entamoeba ELISA mit einem Konkurrenz-ELISA unter Verwendung von Stuhlproben

		Mitbewerber	
		positiv	negativ
RIDASCREEN® Entamoeba	positiv	9	1
	negativ	0	30

Positive Übereinstimmung: 94,7 % negative Übereinstimmung: 98,4 %

Außerdem wurde eine Verdünnungsreihe von zertifizierten *E. histolytica*-Stämmen erstellt und der RIDASCREEN® Entamoeba ELISA im Vergleich zu zwei Mitbewerbern untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Vergleich des RIDASCREEN® Entamoeba ELISA mit 2 Konkurrenz-ELISA unter Verwendung einer *Entamoeba histolytica*- Stammsammlung

<i>E. histolytica</i>	RIDASCREEN® Entamoeba MW [OD 450/620]	ELISA 1 MW [OD 450/620]	ELISA 2 MW [OD 450/620]
Stamm HM1:IMSS			
1:10	2,428 +++	3,734 +++	2,533 +++
1:10 ²	3,840 +++	3,566 +++	1,806 +++
1:10 ³	3,885 +++	0,514 -	0,894 ++
1:10 ⁴	3,678 +++	0,015 -	0,313 +
1:10 ⁵	2,528 +++	-0,003 -	0,208 +
1:10 ⁶	0,890 ++	-0,006 -	0,146 +
Stamm HK9			
1:10	3,129 +++	3,493 +++	2,084 +++
1:10 ²	3,594 +++	3,397 +++	1,498 ++
1:10 ³	3,683 +++	0,750 ++	0,668 ++
1:10 ⁴	3,520 +++	0,050 -	0,251 +
1:10 ⁵	1,695 +++	-0,004 -	0,152 +
1:10 ⁶	0,696 ++	-0,003 -	0,121 -
Stamm 200:N1H			
1:10	2,269 +++	3,514 +++	2,654 +++
1:10 ²	3,601 +++	3,464 +++	1,975 +++
1:10 ³	3,638 +++	2,616 +++	1,245 ++
1:10 ⁴	3,672 +++	0,327 +	0,444 +
1:10 ⁵	3,239 +++	0,055 -	0,236 +
1:10 ⁶	0,996 ++	0,003 -	0,138 +

OD450/620 ≥ 1,5: +++

OD450/620 0,5 - 1,5: ++

OD450/620 < 0,5: +

OD450/620 < Cut-off: -

13.3 Kreuzreaktivität

Verschiedene pathogene Keime des Intestinaltraktes wurden mit dem RIDASCREEN® Entamoeba-Test untersucht und zeigten mit Ausnahme von *Campylobacter coli* keine Kreuzreaktivität.

Durchgeführt wurden die Untersuchungen mit unverdünnten Bakterien- oder Virussuspensionen, die eine Konzentration von 10⁶ bis 10⁹ Organismen/ml aufwiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tab. 5: Kreuzreaktionen mit pathogenen Mikroorganismen

Testkeim	Herkunft	[OD 450/620] Mittelwert
<i>Adenovirus</i>	Zellkulturüberstand	-0,002
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Kultur	-0,005
<i>Arcobacter butzleri</i>	Kultur	0,008
<i>Astrovirus</i>	Zellkulturüberstand	0,001
<i>Bacillus cereus</i>	Kultur	0,003
<i>Bacteroides fragilis</i>	Kultur	-0,005
<i>Campylobacter coli</i>	Kultur	0,196
<i>Campylobacter jejuni</i>	Kultur	0,017
<i>Candida albicans</i>	Kultur	0,019
<i>Citrobacter freundii</i>	Kultur	0,016
<i>Clostridium difficile</i>	Kultur	0,042
<i>Clostridium perfringens</i>	Kultur	0,006
<i>Clostridium sordellii</i>	Kultur	0,007
<i>Cryptosporidium muris</i>	Kultur	0,002
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kultur	0,006
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Kultur	-0,002
<i>E. coli</i> (O6)	Kultur	0,026
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Kultur	0,020
<i>Enterobacter cloacae</i>	Kultur	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur	0,000
<i>Giardia lamblia</i>	Stuhl	0,004
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kultur	0,032
<i>Proteus vulgaris</i>	Kultur	0,003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kultur	0,002
<i>Rotavirus</i>	Zellkulturüberstand	-0,003
<i>Salmonella enteritidis</i>	Kultur	-0,004
<i>Salmonella typhimurium</i>	Kultur	0,004
<i>Serratia liquefaciens</i>	Kultur	-0,004
<i>Shigella flexneri</i>	Kultur	0,018
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kultur	0,015
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kultur	-0,001
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Kultur	-0,002
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kultur	0,001

13.4 Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay Reproduzierbarkeit wurden 40 Replikate von 6 Referenzen gemessen, die den gesamten Messbereich von negativ bis hoch positiv abdecken. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten (VK) wurden für 3 Kit Lots ermittelt. Für die Inter-Assay Reproduzierbarkeit wurden die Referenzen an 10 verschiedenen Arbeitstagen mit 2 Läufen am Tag in Duplikaten gemessen. Die Messungen wurden mit 3 Kit Lots und von 3 Technikern durchgeführt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde über alle 3 Kit Lots ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Reproduzierbarkeit/Präzision des RIDASCREEN® Entamoeba ELISA

Referenz		Intra-assay			Inter-assay			Inter-lot
		Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1	Kit Lot 2	Kit Lot 3	Kit Lot 1-3
1	MW [OD 450/620]	1,901	1,402	1,465	1,581	1,707	1,507	1,598
	VK (%)	6,07 %	8,39 %	5,91 %	17,00 %	16,70 %	18,71 %	18,17 %
2	MW [OD 450/620]	1,375	1,095	1,209	1,155	1,253	1,124	1,177
	VK (%)	5,82 %	7,45 %	5,74 %	13,71 %	14,97 %	16,25 %	15,74 %
3	MW [OD 450/620]	1,091	0,976	0,810	0,933	1,010	0,869	0,937
	VK (%)	5,31 %	10,58 %	6,07 %	16,20 %	15,17 %	14,00 %	16,68 %
4	MW [OD 450/620]	0,606	0,532	0,512	0,507	0,556	0,461	0,508
	VK (%)	5,45 %	6,44 %	7,93 %	19,52 %	14,33 %	17,21 %	19,08 %
5	MW [OD 450/620]	0,350	0,325	0,204	0,306	0,330	0,276	0,304
	VK (%)	6,61 %	12,20 %	16,90 %	19,78 %	17,50 %	21,16 %	20,92 %
6	MW [OD 450/620]	-0,001	-0,002	0,000	0,012	0,001	0,005	0,006
	VK (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

13.5 Interferierende Substanzen

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse, wenn sie in die Überstände Entamoeba-positiver und Entamoeba-negativer Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen eingemischt wurden:

Muzin	5,0 % w/w	Diclofenac	0,1 % v/w
Humanblut	5,0 % v/w	Cyclamate	1,3 % v/w
Pepto-Bismol	6,3 % v/w	Stearinsäure/ Palmitinsäure	40 % w/w (1:1)
Loperamid	0,02 % w/w	Metronidazol (0,5 %-ige Lösung)	3,0 % (v/w)










Im Fall von Bariumsulfat (18,5 % w/w) wurde eine mögliche Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht. Diese Untersuchung einer Verdünnungsreihe mit Bariumsulfat ergab jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration und den OD-Werten. Die einzige Ausnahme ist die höchste getestete Konzentration, die jedoch noch über der bereits im ersten Ansatz getesteten „worst-case“ Konzentration (3-fache Tagesdosis) liegt. Daher ist eine Interferenz von Bariumsulfat als unwahrscheinlich anzusehen.

14. Versionsübersicht



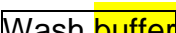
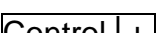
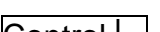
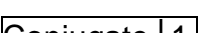
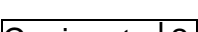


Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-04-20	Vorversion
2019-07-10	Generelle Überarbeitung 4. Packungsinhalt 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9.2 Herstellung des Waschpuffers 9.5 Waschen 9.8 Dritte Inkubation 13.2 Mittbewerbervergleich

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

	Microtiterplatte
	Probenverdünnungspuffer
	Waschpuffer
	Positivkontrolle
	Negativkontrolle
	Konjugat 1
	Konjugat 2
	Substrat
	Stopp-Reagenz

16. Literatur

1. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. *Clin. Microbiol.* 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
2. Citronberg, R. J., Semel, J. D.: Severe vaginal infection with *Entamoeba histolytica* in a woman who recently returned from Mexico: Case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 20, 700 - 702 (1995).
3. Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A.: *Entamoeba histolytica*: Mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* 79, 424 - 435 (1994).
4. Katzwinkel-Wladarsch, S. et al.: Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimen. *Am. J. Trop. Med.-Hyg.* 51 (1), 115 - 118 (1994).
5. Kean, B. H. et al.: Epidemic of amoebiasis and giardiasis in a biased population. *Brit. J. Ven. Dis.* 55, 375 - 378 (1979).
6. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. *Der Mikrobiologe* 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
7. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (2), 180 - 182 (1994).
8. Petter, R. et al.: Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L 21 from pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Gene* 150, 181 - 186 (1994).
9. Reed, Sh. L.: New Concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. *Clin. Infect. Dis.* 21 (Suppl. 2), 182 - 185 (1995).
10. Strachan, W. D. et al.: Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Lancet* 12, 561 - 563 (1988).
11. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 2, 2659 - 2665 (1996).