

RIDASCREEN[®] Entamoeba histolytica IgG

Art. No.: K1721



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +496151 8102-0 / Telefax: +496151 8102-20



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG-Test ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Entamoeba histolytica in humanem Serum.

Der Test sollte bei begründetem Verdacht auf eine Amoebiasis durchgeführt werden.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Entamoeba histolytica ist ein humanpathogenes Protozoon und ist einer der häufigsten Erreger in Entwicklungsländern besonders im tropischen und subtropischen Raum.⁴ Jährlich infizieren sich schätzungsweise 50 Millionen Menschen und 100.000 sterben an den Folgen der Infektion.¹ Die Erreger werden auf dem fäkal-oralen Weg übertragen. Hierbei werden infektiöse Zysten oral aufgenommen, welche sich im Dünndarm in die vegetativen Trophozoiten entwickeln und sich anschließend im Dickdarm ansiedeln.³ 10% der infizierten Patienten entwickeln eine invasive Amoebiasis, die durch die Invasion des Parasiten aus dem Darmlumen in die Schleimhaut des Kolons ausgelöst wird.⁵ Die Inkubationszeit ist sehr variabel und kann von einigen Tagen über Monate und sogar Jahre dauern. In der Regel liegt diese bei einer intestinalen Amoebiasis bei 1 - 4 Wochen.¹¹

Klinische Symptome einer intestinalen Amoebiasis sind krampfartige Bauchschmerzen begleitet von Übelkeit und starke Durchfälle mit blutigen und schleimigen Stühlen. Bei einer akuten Amöben-Dysenterie können durch hämatogene Streuungen extraintestinale Komplikationen wie Leberabszesse entstehen, die unbehandelt meist einen tödlich endenden Verlauf nehmen.³

Nach einer Infektion mit Entamoeba histolytica setzt als Reaktion des Immunsystems die Bildung spezifischer Antikörper gegen den Erreger ein. Diese können im Serum mit Hilfe von immunologischen Verfahren nachgewiesen werden. Für die Aussagekraft eines Tests ist dabei neben der Auswahl des verwendeten erregerspezifischen Antigens auch die verwendete Testmethode von Bedeutung.

3. Testprinzip

Die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen ist mit gereinigten Antigenen beschichtet. In Patientenproben vorhandene Antikörper binden an die Antigene und werden in einem zweiten Schritt mit Enzym-markiertem Protein A (Konjugat) nachgewiesen. Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat (Harnstoffperoxid/TMB) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm).

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Plate	96 Best.	Mikrotiterplatte, 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit Antigen von <i>Entamoeba histolytica</i>
Diluent	100 ml	Probenpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, gebrauchsfertig; gelb gefärbt
SeroWP	100 ml	Waschpuffer, 10fach konzentriert; Tris-gepufferte NaCl-Lsg.
Control + <i>roter Deckel</i>	1,2 ml	IgG-Positivkontrolle, Humanserum, gebrauchsfertig
Control - <i>farbloser Deckel</i>	2,5 ml	IgG-Negativkontrolle, Humanserum, gebrauchsfertig
Conjugate <i>oranger Deckel</i>	12 ml	Protein A-Konjugat; gebrauchsfertig; Peroxidase-konjugiertes Protein A in stabilisierter Proteinlösung
SeroSC	12 ml	Substrat H ₂ O ₂ /Tetramethylbenzidin; gebrauchsfertig
Stop	12 ml	Stopp-Reagenz 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig

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

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Das Testkit ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) fünf Tage haltbar. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel, in dem sich die Mikrotiterplatte befindet, ist so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel zu lagern.

Eine Kontamination der Reagenzien ist ebenso zu vermeiden wie eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 – 100 µl und 100 – 1000 µl Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter \geq 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Hypochloritlösung

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 Reagenzien und 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) www.r-biopharm.com.

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Positivkontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HbsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potentiell infektiös behandelt und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

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

Der Test ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Nach der Blutentnahme sollte zur Vermeidung einer Hämolyse das Serum möglichst schnell vom Blutkuchen getrennt werden. Die Proben sind bis zur Testung kühl oder gefroren zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Tab. 1: Probenlagerung

unverdünntes Serum		verdünntes Serum
2 – 8 °C	- 20 °C	2 – 8 °C
1 Woche	> 1 Woche	7 Stunden

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen 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 ist das Kit sofort wieder bei 2 – 8 °C zu lagern.

Es sollte nur soviel Reagenz entnommen werden, wie für die Durchführung des Tests benötigt wird. Überschüssiges Reagenz darf nicht in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

Die Mikrotiterstreifen können nicht mehrfach verwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Waschpuffer, Probenpuffer und Substrat sind nicht testspezifisch; sie können auch bei den anderen RIDASCREEN® ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Parasiten verwendet werden.

9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **SeroWP** wird mit 9 Teilen destillierten Wassers gemischt. Hierfür werden 100 ml des Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) fünf Tage haltbar.

9.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer **Diluent** 1:50 verdünnt.

z. B. 10 µl Serum + 490 µl **Diluent**

Achtung!

Negativkontrolle und Positivkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.

9.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen **Control -** und **Control +** jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubiert. Es wird empfohlen, die Negativkontrolle **Control -** in Doppelbestimmung durchzuführen.

9.5. Waschen

Die Kavitäten sollten in einen Abfallbehälter mit Hypochloritlösung zur Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5 mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten. Nach dem Waschen sollte die Platte auf saugfähigem, sauberem Papier ausgeklopft werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

9.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl des Protein A-Konjugates **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) inkubiert.

9.7. Waschen

5maliges Waschen gemäß Pkt. 9.5.

9.8. Dritte Inkubation

Zugabe von je 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) 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 in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

10. Qualitätskontrolle - Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positivkontrolle und Negativkontrolle (in Doppelbestimmung) mit zu führen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle bei 450 nm kleiner 0,3 ist. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 25 % vom Mittelwert ab, muss der Test wiederholt werden. Der Extinktionswert der Positivkontrolle bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm) muss größer 0,8 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 einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

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

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

11. Auswertung und Interpretation

11.1. Berechnung des Proben-Index

1. Der Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle wird berechnet.
2. Zum Extinktionsmittelwert wird 0,150 addiert. Als Ergebnis erhält man den cut-off des Tests.
3. Durch Division des Extinktionswertes der Probe durch den cut-off erhält man den Proben-Index.

z. B.: Negativkontrolle 1 O.D. = 0,115
 Negativkontrolle 2 O.D. = 0,125
 Probe O.D. = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{Proben-Index} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

11.2. Testergebnis

Tab. 2: Bewertung des Proben-Index

	negativ	grenzwertig	positiv
Proben-Index	< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG ELISA weist IgG-Antikörper gegen Entamoeba histolytica nach. Er sollte bei begründetem Verdacht auf eine Amoebiasis durchgeführt werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild und anderen diagnostischen Befunden zu interpretieren.

Antikörpersignale sind abhängig von der Lokalisation des Parasitenbefalls und können von Patient zu Patient variieren.

Bei einem Amöben-positiven Stuhlbeleg ermöglicht ein positiver Antikörpernachweis die Identifizierung von Entamoeba histolytica sensu stricto als Ursache für die klinische Symptomatik.

Bei Verdacht auf eine extraintestinale Streuung des Parasiten kann ein positiver Antikörpernachweis auch bei einem negativen Stuhlbeleg auf eine Amöbiasis hinweisen; der Befund sollte durch klinische Symptome und andere diagnostische Verfahren bestätigt werden.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Amoebiasis nicht aus. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion kann der Antikörpertiter so gering sein, dass der Test negativ oder grenzwertig ausfällt. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Amoebiasis, sollte nach wenigen Tagen eine weitere Serumprobe untersucht werden.

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

13. Leistungsmerkmale

Tab. 3: Inter-Assay-Varianz (n=30)

<u>Inter-Assay-Varianz</u>	<u>IgG</u>	
	Index	VK
Serum 1	4,52	7,1 %
Serum 2	2,63	5,1 %
Serum 3	2,42	10,1 %
Serum 4	0,24	n/a

Tab. 4: Intra-Assay-Varianz (n=23)

<u>Intra-Assay-Varianz</u>	<u>IgG</u>	
	Index	VK
Serum 1	4,40	12,3 %
Serum 2	1,78	4,7 %
Serum 3	1,54	3,5 %
Serum 4	0,32	n/a

Tab. 5: Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu einem anderen, kommerziellen ELISA

	ELISA
Sensitivität	100,0%
Spezifität	100,0%

Tab. 6: Ergebnisse mit 200 untersuchten Blutspendeseren aus einem Blutspendezentrum in Deutschland

	negativ	grenzwertig	positiv
200 Blutspendeseren	96,5%	2,0%	1,5%

Literatur

1. WHO/PAHO/UNESCO report: A consultation with experts on amoebiasis. Epidemiol Bull. 18,13–14 (1997).
2. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. Clin. Microbiol. 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
3. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A.: Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev. 13, 318-31 (2000)
4. Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J.: Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 20, 511-32 (2007)
5. Gathiram, V., and Jackson T. F.: A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. S. Afr. Med. J. 72, 669–672 (1987).
6. 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).
7. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. Der Mikrobiologe 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
8. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51 (2), 180 - 182 (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. Tanyuksel M., Petri W.A. Jr.: Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 16, 713-29 (2003)
12. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. Deutsches Ärzteblatt 93, Heft 51-52, 2659 - 2665 (1996).