



Serazym[®] Entamoeba histolytica

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Entamoeba histolytica* in Stuhlproben

REF E-018-A  96  *In-vitro*-Diagnostikum CE



Seramun Diagnostica GmbH · Spreenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Entamoeba histolytica ist der Erreger der Amoebiasis (Amöbenruhr, Amöben-Leberabszess) beim Menschen. Das weltweit vorkommende Protozoon gelangt vornehmlich mit fäkal-kontaminierten Nahrungsmitteln als runde, unbewegliche Dauerform (Zysten) in den Darm. Die im Darmlumen freiwerdenden vegetativen Trophozoiten vermehren sich durch Zweiteilung. Nur die Trophozoiten virulenter Stämme dringen in die Darmwand ein und verursachen Geschwüre, die zu Blut- und Schleimbeimengungen im Stuhl führen. Über das enterale Blutgefäßsystem in die Leber gelangende Amöben sind Ursache ausgedehnter Abszesse (1). Inzwischen gilt die Klassifizierung dieser virulenten Stämme als eigenständige Species *Entamoeba histolytica* auf der Grundlage molekularbiologischer (PCR) und biochemischer (Isoenzymanalyse) Methoden als gesichert (1 - 6). Demgegenüber wird die apathogene, nicht invasive Form als *Entamoeba dispar* bezeichnet. Die beiden Species sind morphologisch nicht unterscheidbar und können daher mikroskopisch nicht voneinander differenziert werden.

Der enzymimmunologische Nachweis von spezifischen *Entamoeba histolytica* Antigenen, die mit dem Stuhl ausgeschieden werden, stellt eine sichere und schnelle Alternative zur Mikroskopie dar (6).

Literatur:

1. Lunzen, J.v., Tannich, E., Burchard, G.-D. (1996): „Amöbenruhr und Amöbenleberabszess“. Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen. 93. Jahrgang/Heft 51-52, C: Seite 2390-2397
2. Gonzalez-Ruiz, A. et al. (1994): „Diagnosis of Amebic Dysentery by Detection of Entamoeba histolytica Fecal Antigen by an Invasive Strain-Specific, Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked- Immunosorbent Assay“. Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 32, No. 4, p. 964-970
3. Blakely, P., Sargeant, P.G. and Reed, S.L. (1990): „An immunogenic 30-kDa Surface Antigen of Pathogenic Clinical Isolates of Entamoeba histolytica“. The Journal of Infectious Diseases 162: 949-954
4. Stanley S.L. et al. (1995): „The Serine-rich Entamoeba histolytica Protein is a Phosphorylated Membrane Protein Containing O-Linked Terminal N-Acetylglucosamine Residues“. The Journal of Biological Chemistry Vol. 270, No. 8, p. 4121-4126
5. Tachibana H. et al. (1991): „Differences in genomic DNA Sequences between Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of Entamoeba histolytica Identified by Polymerase Chain Reaction“. Journal Of Clinical Microbiology Vol. 29, No. 10, p. 2234-2239
6. Mirelman D., Nuchamowitz Y. and Stolarsky T. (1997): „Comparison of Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Kits and PCR Amplification of rRNA Genes for Simultaneous Detection of Entamoeba histolytica and E. dispar“. Journal Of Clinical Microbiology Vol. 35, No. 9, p. 2405-2407

Anwendungsbereich

Der **Serazym®** Entamoeba histolytica ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis von *Entamoeba histolytica* in Stuhlproben.

Testprinzip

Serazym® Entamoeba histolytica ist ein schneller immunenzymometrischer Zwei-Schritt-Assay auf der Basis polyklonaler Peptidantikörper, die zwei differente Epitope des für *E. histolytica* spezifischen serinreichen 30 kD Membranproteins (SREHP) erkennen. Verdünnte, unbehandelte Stuhlproben sowie positive und negative Kontrollen reagieren im ersten Inkubationsschritt (60 min, Raumtemperatur) mit den Festphase-insolubilierten anti-SREHP-Antikörpern. Ungebundene Komponenten werden im nachfolgenden Waschzyklus entfernt. Im nächsten Inkubationsschritt (30 min, Raumtemperatur) erfolgt die Reaktion der Festphase-gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-SREHP-Antikörpern (Konjugat). Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch sich die blaue Produktlösung gelb färbt. Die bei 450 / \geq 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endproduktes ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

Für 96 Kavitäten

1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti-SREHP-Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung hellbraun vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle SREHP-Peptid	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>Entamoeba histolytica</i> negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte polyklonale anti-SREHP-Antikörper (Schaf)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt violette Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder eingefroren bei -20°C gelagert werden. Wiederholtes (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Unbehandelte Stuhlproben

Stuhlproben auf Raumtemperatur erwärmen und gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm), bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig suspendieren (Vortex). Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Konservierte Stuhlproben

Konservierte oder in Transportmedien gelagerte Stuhlproben sollten im *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* nicht eingesetzt werden.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck ist ausreichend für 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem Aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 μ l Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium (3).

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Probe** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD- Konjugat (6) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
9. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
10. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
11. Messen der OD bei 450 nm / \geq 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 min.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,20

Proben mit OD-Werten gleich oder höher als die des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Entamoeba histolytica zu bewerten.

Referenzwert

<i>Serazym</i> [®] Entamoeba histolytica	
Positiv	\geq Cut-off
Negativ	$<$ Cut-off

Aufgrund von Unterschieden in der Population wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen pathologischen und normalen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle \leq 0,20 (manuelle Abarbeitung)
 \leq 0,30 (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle \geq 0,80

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

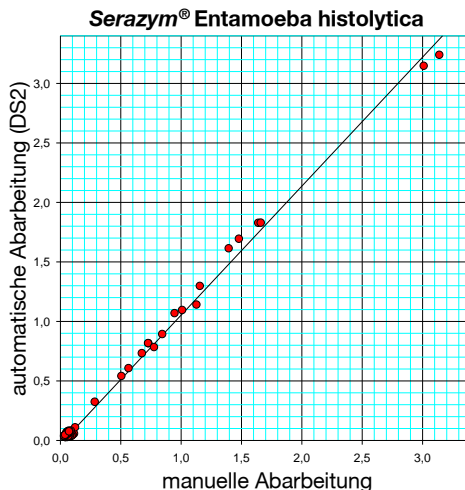
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Entamoeba histolytica* Antigenen in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung oder ungenügende Homogenisierung der Proben können zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen. Ein negatives Ergebnis im ELISA schließt eine Infektion mit *Entamoeba histolytica* nicht aus, da bei invasiver Amoebiasis die Zahl der mit dem Stuhl ausgeschiedenen Antigene unter die Nachweisempfindlichkeit des Testes sinken kann. Daher sollten bei negativem Testergebnis aber dringendem klinischen Verdacht auf eine invasive Amoebiasis weitere Untersuchungen (z.B. Antikörper-Nachweis oder bildgebende Verfahren) durchgeführt werden. Die Gesamtinterpretation des Testergebnisses im ELISA sollte im Zusammenhang mit dem klinischen Bild erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Höhe des maximal zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Programmierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 140 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,998 ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*[®] Entamoeba histolytica aus 40-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	2,022	0,055	2,7
2	1,106	0,024	2,1
3	0,413	0,020	4,9

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym*[®] Entamoeba histolytica von Proben in insgesamt 40 Testansätzen, verteilt auf 20 Tage und 2 Operatoren in Doppelbestimmung:

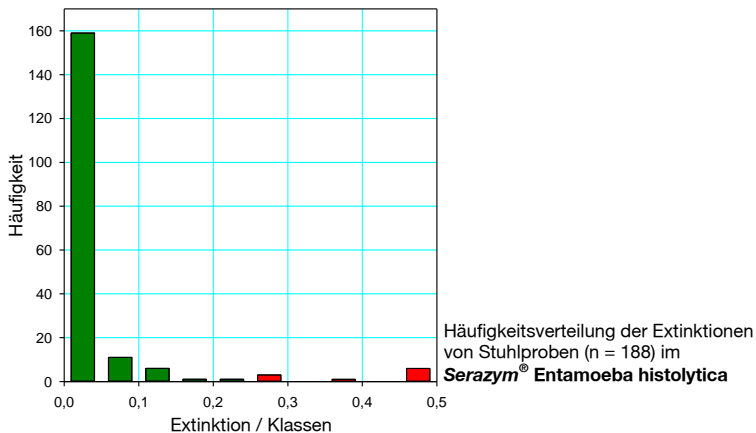
Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,448	0,133	9,2
2	0,883	0,067	7,6
3	0,374	0,035	9,4

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze des *Serazym*[®] Entamoeba histolytica wurde durch Titration von mit *E. histolytica* HM-1:IMSS (ATCC 30459) Trophozoiten aufgestockten negativen Stuhlproben mit < 150 Trophozoiten/ml bestimmt.

Spezifität

Ein Proben-Kollektiv von insgesamt n = 188 Stuhlproben (mikrobiologisches Routinelabor) wurden im *Serazym*[®] Entamoeba histolytica untersucht. Davon wurden n = 178 Proben als negativ bewertet und n=10 Proben als positiv. Die n=10 Proben wurden mit einem Referenztest als negativ bewertet und für das untersuchte Proben-Kollektiv ergibt sich eine Spezifität von 94,7%.



Spezifität und Sensitivität

Spezifität und Sensitivität des *Serazym*[®] Entamoeba histolytica wurden im Rahmen einer retrospektiven Studie im Vergleich zu einem kommerziell erhältlichen ELISA bestimmt.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	14	5**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	2*	18

Spezifität: 78,3% Sensitivität: 85,7%

Die mit * und ** gekennzeichneten Proben wurden an einem externen Labor mittels PCR Antigen-Nachweis nachuntersucht. Daraus ergibt sich eine korrigierte Spezifität von 81,8% und eine korrigierte Sensitivität von 100%.

Kreuzreaktivität

Folgende Mikroorganismen wurden mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml in Verdünnungsmedium getestet und im *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* als negativ bewertet (OD 450 / 620nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC (7966)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC (11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC (6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC (25285)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC (8090)
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC (9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC (13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC (13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC (29212)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC (13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC (27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC (8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC (14028)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC (13076)
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC (12022)
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC (25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC (17802)
<i>Candida albicans</i>	ATCC (10231)

<i>Campylobacter coli</i>	ATCC (33559)
<i>Campylobacter jejunii</i>	ATCC (32291)
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC (27374)
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC (43954)
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC (35221)
<i>Vibrio cholerae</i>	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> RKI 0803733	klinisches Isolat
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC (51741)
<i>Salmonella anatum</i>	ATCC (9270)
<i>Salmonella paratyphi</i> A	ATCC (11511)
<i>Salmonella paratyphi</i> B	ATCC (8759)
<i>Salmonella paratyphi</i> C	Nr. 2 Pasteur
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM (20481)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC (29906)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC (13525)
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC (49128)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC (13813)
<i>Morganella morganii</i>	ATCC (25830)

Stuhlproben, die *Entamoeba dispar* in hohen Konzentrationen (mindestens $3,9 \cdot 10^5$ KBE/ml Probe) enthalten, können zu einem positiven Signal im *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* ELISA führen.

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu *E. histolytica* positiven und negativen Stuhlproben keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf 100 mg Stuhlprobe.:

(-)-Scopolamine N-butyl bromid (0,5%, Buscopan[®]), Bariumsulfat (5%), Bismuth(III) subsalicylate (0,5%, Pepto-Bismol), Cyclamat (5%), Diclofenac (0,5%), Hämoglobin human (5%), Blut human (5%), Hylak[®] N (5%), Iberogast[®] (5%), Immodium[®] akut duo (0,06/3,8%), Loperamid hydrochloride (5%, Loperamid-CT akut), Metronidazol (0,5%), Mucin (5%), Nexium[®] (0,06%), Nifuroxazide (0,5%, Pentofuryl[®]), Palmitinsäure (20%), Perenterol forte (0,5%), Rennie[®] (20%), Simagel[®] (1%), Stearinsäure (20%), Vancomycin (0,5%)

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazym*[®] Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potenziell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.



Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!







Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!

Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-02-02	Testdurchführung	Aktualisierung

Inkubationsschema *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* (E-018-A)

1.  100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 30 min Inkubation (Raumtemperatur)
 5 x Waschen mit Waschlösung
3.  3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur, lichtgeschützt)
4.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)
Messung der OD bei 450 / ≥ 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Entamoeba histolytica

Enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in faecal samples

REF E-018-A  96  *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Entamoeba histolytica is the causative agent of amoebiasis (amoebic dysentery, amoebic liver abscess). Only trophozoites of virulent strains invade the intestinal wall and cause ulcers releasing blood and mucous into the faeces. Invasive Amoebae reach the liver via the enteral vascular system and cause extensive abscesses (1). The infectious cysts are spread via faecal-oral transmission. The vegetative trophozoites are released by excystation and multiply by bisection.

Meanwhile molecular biological (PCR) and biochemical (isoenzyme analysis) methods confirm the classification of the pathogenic, invasive strains as separate species *Entamoeba histolytica*. The non-invasive strains are classified as *Entamoeba dispar*. The two species share an identical morphology and therefore a microscopic differentiation is impossible (1 - 6).

Entamoeba histolytica releases specific antigens into the intestine during its life cycle. These antigens are excreted with the faeces of infected persons. The antigen detection by enzyme immunoassay can serve as specific and easy to perform alternative to microscopy.

References:

1. Lunzen, J.v., Tannich, E., Burchard, G.-D. (1996): „Amöbenruhr und Amöbenleberabszess“. Deutsches Ärzteblatt-Ärztliche Mitteilungen. 93. Jahrgang/Heft 51-52, C: Seite 2390-2397
2. Gonzalez-Ruiz, A. et al. (1994): “Diagnosis of Amebic Dysentery by Detection of *Entamoeba histolytica* Fecal Antigen by an Invasive Strain-Specific, Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked- Immunosorbent Assay“. Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 32, No. 4, p. 964-970
3. Blakely, P., Sargeant, P.G. and Reed, S.L. (1990): „An immunogenic 30-kDa Surface Antigen of Pathogenic Clinical Isolates of *Entamoeba histolytica*“. The Journal of Infectious Diseases 162: 949-954
4. Stanley S.L. et al. (1995): „The Serine-rich *Entamoeba histolytica* Protein is a Phosphorylated Membrane Protein Containing O-Linked Terminal N-Acetylglucosamine Residues“. The Journal of Biological Chemistry Vol. 270, No. 8, p. 4121-4126
5. Tachibana H. et al. (1991): „Differences in genomic DNA Sequences between Pathogenic and Nonpathogenic Isolates of *Entamoeba histolytica* Identified by Polymerase Chain Reaction“. Journal Of Clinical Microbiology Vol. 29, No. 10, p. 2234-2239
6. Mirelman D., Nuchamowitz Y. and Stolarsky T. (1997): „Comparison of Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Based Kits and PCR Amplification of rRNA Genes for Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*“. Journal Of Clinical Microbiology Vol. 35, No. 9, p. 2405-2407

Intended use

The **Serazym®** *Entamoeba histolytica* is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of *Entamoeba histolytica* specific antigen in faecal samples.

Principle of the test

Serazym® *Entamoeba histolytica* is a fast enzymometric two-step immunoassay based on polyclonal peptide antibodies recognizing two different epitopes of the serine-rich 30 kD membrane protein (SREHP) of *Entamoeba histolytica*.

Diluted stool specimens as well as positive and negative controls react in the first incubation step of 60 minutes at room temperature with the solid phase bound antibodies. In the following washing step unbound components are removed from the wells.

In the next step horseradish-peroxidase (HRP) labelled antibodies react with solid phase bound antibody-antigen-complexes within a reaction time of 30 minutes at room temperature. Non-bound material is separated from the solid-phase immune complexes by a subsequent washing step.

HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells after 10 min incubation at room temperature turning the solution from blue to yellow.

The optical density (OD) of the solution read at 450 / \geq 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Entamoeba histolytica* antigen.

Test components

			For 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti-SREHP- antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips colour coding light brown vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control SREHP peptide	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control <i>Entamoeba histolytica</i> negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled, polyclonal anti-SREHP- antibodies (Sheep)	15 ml · ready to use coloured green violet cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap

Preparation and storage of samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 h. Longer storage is possible at -20°C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8°C before testing. Faecal samples that are already diluted in transportation media should not be used.

Preparation

Warm samples to room temperature and mix well. Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary, sediment floating particles by a centrifugation step with a micro centrifuge for one min at maximum speed.

Materials required but not provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer · microplate reader with optical filters of 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay.

The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay procedure

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 µl faeces + 1.0 ml sample diluent (3). Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that residual fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette : 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted sample**
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Dispense 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Dispense 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
9. Incubate for 10 min at RT protected from light.
10. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
11. Read OD at 450 nm / \geq 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.20

Samples with absorbances equal to or higher than the cut-off value are considered positive, samples with absorbances below the cut-off value are considered negative for *Entamoeba histolytica* antigen.

Reference values

Serazym® Entamoeba histolytica	
Positive	\geq Cut-off
Negative	$<$ Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters, too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is \leq 0.20 (manual performance)
 \leq 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is \geq 0.80

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

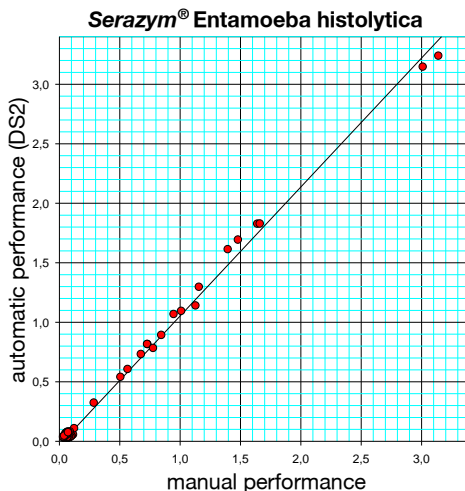
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions and not sufficiently homogenized samples can cause false results. A negative ELISA result does not exclude an *Entamoeba histolytica* infection, because the number of excreted cysts can decrease below the detection limit of the assay in invasive amoebiasis. Thus additional investigations (e. g. detection of specific antibodies or ultrasound) should be performed in case of a negative ELISA result but clinical suspect. Clinical findings have to be considered for a final result interpretation.

Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

Correlation: manual vs. automatic processing

A panel of 140 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.998$.



Performance characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Entamoeba histolytica calculated from 40-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	2.022	0.055	2.7
2	1.106	0.024	2.1
3	0.413	0.020	4.9

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym*[®] Entamoeba histolytica calculated from 2-fold determinations of samples in a total of 40 test runs, spread over 20 days and 2 operators:

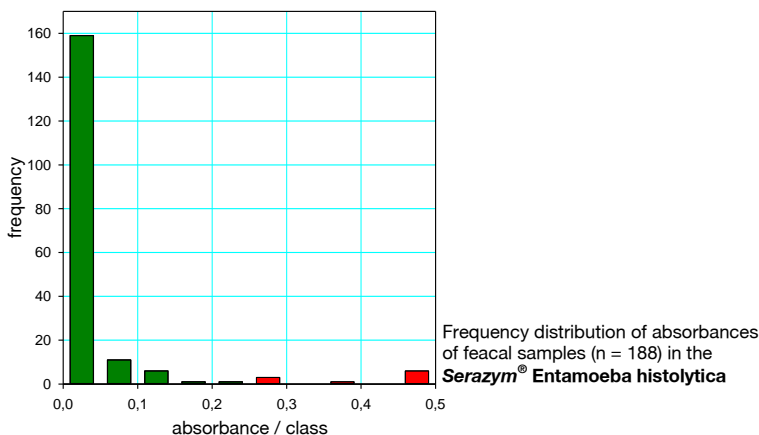
sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.448	0.133	9.2
2	0.883	0.067	7.6
3	0.374	0.035	9.4

Lower detection limit

The lower detection limit of *Serazym*[®] Entamoeba histolytica has been determined by titration of faecal samples spiked with *E. histolytica* HM-1:IMSS (ATCC 30459) trophozoites. The lower detection limit is < 150 trophozoites/ml.

Specificity

A panel of in all n = 188 stool samples (microbiological routine laboratory) were tested in the *Serazym*[®] Entamoeba histolytica. Of these, n = 178 samples were determined as negative and n = 10 samples as positive. The n = 10 samples were determined as negative with a reference test and a specificity of 94.7% is obtained for this panel of samples.



Specificity and sensitivity

Specificity and sensitivity of the *Serazym*[®] Entamoeba histolytica have been determined in a retrospective study in comparison to another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	14	5**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	2*	18

Specificity: 78.3% Sensitivity: 85.7%

The samples labeled with * and ** were re-tested at an external laboratory using PCR antigen detection. This results in a corrected specificity of 81.8% and a corrected sensitivity of 100%.

Cross reactivity

The following microorganisms were diluted in sample diluent with $\geq 10^8$ colony forming units and tested negative with the *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica*. (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC (7966)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC (11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC (6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	ATCC (25285)
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC (8090)
<i>Clostridium sordelli</i>	ATCC (9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC (13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC (13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC (29212)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25922)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC (13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	ATCC (27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC (8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>thyphimurium</i>	ATCC (14028)
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>galolyticus/enteritidis</i>	ATCC (13076)
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC (12022)
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC (25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC (17802)
<i>Candida albicans</i>	ATCC (10231)

<i>Campylobacter coli</i>	ATCC (33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC (32291)
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC (27374)
<i>campylobacter upsaliensis</i>	ATCC (43954)
<i>Campylobacter lari</i>	ATCC (35221)
<i>Vibrio cholerae</i>	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> Y11	clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> RKI 0803733	clinical isolate
<i>Clostridium difficile</i>	VPI 10463
<i>Salmonella infantis</i>	ATCC (51741)
<i>Salmonella anatum</i>	ATCC (9270)
<i>Salmonella paratyphi</i> A	ATCC (11511)
<i>Salmonella paratyphi</i> B	ATCC (8759)
<i>Salmonella paratyphi</i> C	Nr. 2 Pasteur
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM (20481)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC (29906)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC (13525)
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC (49128)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC (13813)
<i>Morganella morganii</i>	ATCC (25830)

Faecal samples containing *Entamoeba dispar* in high concentrations (at least $3.9 \cdot 10^5$ cfu/ml sample) may occur a positiv signal in the *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* ELISA.

Interference

None of the following substances added to *E. histolytica* positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result: The mentioned concentrations refer to 100 mg faeces.

(-)-Scopolamine N-butyl bromid (0.5%), Buscopan[®], Barium sulfate (5%), Bismuth(III) subsalicylate (0.5%, Pepto-Bismol), Cyclamat (5%), Diclofenac (0.5%), Hemoglobin human (5%), Blood human (5%), Hylak[®] N (5%), Iberogast[®] (5%), Immodium[®] akut duo (0.06/3.8%), Loperamid hydrochloride (5%, Loperamid-CT akut), Metronidazole (0.5%), Mucin (5%), Nexium[®] (0.06%), Nifuroxazide (0.5%, Pentofuryl[®]), Palmitic acid (20%), Perenterol forte (0.5%), Rennie[®] (20%), Simagel[®] (1%), Stearic acid (20%), Vancomycin (0.5%)

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*[®] stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!







Note safety precautions of the single test components!













History of Changes

Version	Section	Modifications
2021-02-02	Assay procedure	Update
	Intended use	Correction

Incubation scheme *Serazym*[®] *Entamoeba histolytica* (E-018-A)

- | | | | |
|----|---|---------------------------------------|--|
| 1. |  | pipette
100 µl
100 µl
100 µl | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONTROL +</div> (4)
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONTROL -</div> (5)
diluted stool sample
60 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution |
| 2. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">CONJ HRP</div> (6)
30 min incubation (room temperature)
 5 x wash with wash solution |
| 3. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">SUBSTR TMB</div> (7)
10 min incubation (room temperature) protected from light |
| 4. |  | 3 drops (or 100 µl) | <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;">STOP</div> (8) |

Read OD at 450 / ≥ 620 nm

	Manufacturer		Date of manufacture		Use by	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">LOT</div>	Batch code	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">REF</div>	Catalog number
	Keep away from sunlight		Temperature limits		Biological risks		Do not reuse		
	Consult instructions for use		Caution	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">IVD</div>	<i>In-vitro</i> -diagnostic medical device			Contains sufficient for <n> tests	