

NovaLisa®

Entamoeba histolytica IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	7
Français	12
Italiano	17
Español	22
Português	27
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía/ Bibliografia	34
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	36

Product Number: ENTG0140 (96 Determinations)

ENGLISH

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 (e.g.)	Transmission route
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amoebiasis	May be asymptomatic; Diarrhea, dysentery, abdominal pain, weight loss, fever and other symptoms depending on the location of the cysts	Oral-Fecal

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy
- PCR
- Serology: e.g. ELISA

2. INTENDED USE

The *Entamoeba histolytica* IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Entamoeba histolytica* in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. 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 specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Entamoeba histolytica* antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled Protein A in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1%; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Entamoeba histolytica* antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37°C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. 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 Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour $\pm$ 5 min at 37 ± 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 Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration 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 important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** 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 (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value 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 standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < 0.100
- **Negative Control:** Absorbance value < 0.200 and $< \text{Cut-off}$
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value $> \text{Cut-off}$

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 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [NTU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
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.		

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.611	4.50
#2	24	0.999	9.29
#3	24	1.186	7.78
Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	17.99	7.73
#2	12	27.58	11.51
#3	12	3.125	14.26

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 98.0% (95% confidence interval: 92.96% - 99.76%).

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 100% (95% confidence interval: 91.19% - 100%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- 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 materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- 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.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates 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 standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	Warning	
	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing spray.
	P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
	P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. 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.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

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 20-60µm 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 infektiös.

Nach oraler Aufnahme infektiöser 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	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amöbenruhr (Amöbiasis)	Kann asymptomatisch sein; Durchfall, Dysenterie, Abdominalschmerz, Gewichtsverlust, Fieber, andere Symptome; abhängig davon, welche Organe befallen sind	Oral-fäkal

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie
- PCR
- Serologie: z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Entamoeba histolytica* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Entamoeba histolytica* in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *Entamoeba histolytica* Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **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 Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugiertem Protein A in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe..
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit *Entamoeba histolytica* Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute 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

Arbeitsanleitung **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 bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/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 $\pm$ 5 min bei 37 ± 1 °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. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...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...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout 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

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **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 Cut-off Kontrolle.

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

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 serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	0,611	4,50
#2	24	0,999	9,29
#3	24	1,186	7,78
Interassay	n	Mittelwert (NTU)	Vk (%)
#1	12	17,99	7,73
#2	12	27,58	11,51
#3	12	3,125	14,26

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 beträgt 98,0% (95% Konfidenzintervall: 92,96% - 99,76%).

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 100% (95% Konfidenzintervall: 91,19% - 100%).

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL für Hämoglobin, von 5 mg/mL Triglyceride und von 0,5 mg/mL für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines Probenpanels mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter ließ keine Anzeichen von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktivitäten erkennen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind 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 Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- 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, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2. 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.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

L'Entamoeba histolytica est un parasite anaérobie qui forme des kystes qui ont quatre petits noyaux et qui ont un diamètre de 10-15 µm. Les kystes sont vigoureux et résistent à des conditions environnementales défavorables. Après l'ingestion par un hôte susceptible (des invertébrés et des vertébrés y compris des humains), le kyste est déchiré, de sorte qu'une amibe émerge par l'ouverture.

L'amibe se divise pendant trois cycles, ce qui résulte en huit trophozoïtes mononucléaires par kyste, qui sont motiles et ont un diamètre de 20-30 µm. Certains de ces trophozoïtes envahissent les tissus du gros intestin et peuvent les éroder tellement intensivement qu'ils entrent dans la circulation sanguine. Ainsi, les amibes peuvent atteindre toutes les parties du corps. L'infection avec l'Entamoeba histolytica se produit dans le monde entier. L'Entamoeba histolytica est l'agent causatif de l'amibiase et de la dysenterie amibienne, et elle habite le lumen et la muqueuse du gros intestin, surtout le cæcum et le côlon transversaux. L'amibiase extra-intestinale peut affliger n'importe quel organe ou tissu. La majorité d'individus infectés ne présentent pas de symptômes. Ceux qui sont symptomatique subissent de diverses manifestations. Des membres de toutes les catégories d'âge et des deux sexes peuvent être infectés. Le risque d'infection augmente dans des conditions sanitaires insatisfaisantes. L'amibiase se produit surtout dans les homosexuels masculins, et parmi des personnes dans les métiers agricoles.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
Entamoeba histolytica	L'amœbose (amibiase, amabiase)	Peut être asymptomatique Diarrhée, dysenterie, douleurs abdominales, perte de poids, de la fièvre et d'autres symptômes en fonction de la localisation des cystes	Orale-Fécale

L'infection ou la présence d'un agent pathogène peut être identifiée par:

- Microscopie
- PCR
- Sérologie: p.ex ELISA

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Entamoeba histolytica IgG ELISA est prévue pour la détection qualitative des anticorps IgG anti-Entamoeba histolytica dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Plaques de Microtitrage sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immunitaire formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'Entamoeba histolytica; en sachets d'aluminium refermables.
- **Tampon de Dilution d'Échantillon IgG:** 1 flacon contenant 100 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH 7,2 ± 0,2; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de Lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 20 mL de protéine A conjugués à peroxydase dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de Substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle Positif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon rouge; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Cut-off:** 1 flacon contenant 3 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon vert; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Contrôle Négatif:** 1 flacon contenant 2 mL contrôle; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon bleu; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 12.1.

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3. Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaques de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20 ... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène d'Entamoeba histolytica. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

6.2. Tampon de Lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de Lavage 1+19; par exemple 10 mL du Tampon de Lavage + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon de Lavage diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3. Solution de Substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le Test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le Test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec Tampon de Dilution d'Échantillon IgG. Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL I Tampon de Dilution d'Échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE TEST

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un système automatique pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de Lavage de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure $\pm$ 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL du Tampon de Lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats!
5. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20...25°C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µL de la Solution de Substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25°C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µL de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la Solution de Substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.1. Mesure

Réglez le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA à **zéro** en utilisant **le Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraite la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ces instructions d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Contrôle Négatif:** Valeur d'absorbance < **0,200** et < **Cut-off**
- **Contrôle Cut-off:** Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle Positif:** Valeur d'absorbance > **Contrôle Cut-off**

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du Contrôle Cut-off.

Exemple: $0,44 \text{ DO Contrôle Cut-off} + 0,42 \text{ DO Contrôle Cut-off} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Résultats en unités [NTU]

$\text{Valeur (moyenne) d'absorbance de l'échantillon} \times 10 = \text{[unités NovaTec = NTU]}$
Cut-off

Exemple: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interprétation des résultats

Cut-off	10 NTU	-
Positif	> 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène sont présents. Il ya eu un contact avec l'antigène (pathogène resp. vaccin).
Zone grise	9 – 11 NTU	Les anticorps dirigés contre l'agent pathogène ne pouvaient pas être détectés clairement. Il est recommandé de répéter le test avec un échantillon frais dans 2 à 4 semaines. Si le résultat est encore dans la zone grise l'échantillon est jugé négatif .
Négatif	< 9 NTU	L'échantillon ne contient pas d'anticorps contre l'agent pathogène. Un contact préalable avec l'antigène (pathogène resp. vaccin) est peu probable.

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	0,611	4,50
#2	24	0,999	9,29
#3	24	1,186	7,78
Inter-essai	n	moyenne (NTU)	CV (%)
#1	12	17,99	7,73
#2	12	27,58	11,51
#3	12	3,125	14,26

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 98,0% (95% Intervalle de confiance 92,96% - 99,76%).

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 100% (95% Intervalle de confiance: 91,19% - 100%).

10.4. Interférences

Des échantillons hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/mL de hémoglobine, 5 mg/mL de triglycérides et 0,5 mg/mL de bilirubine.

10.5. Réaction croisée

L'étude d'un panel d'échantillons avec des anticorps dirigés contre différents paramètres interférents n'a pas révélé de preuves de résultats faussement positifs dus à des réactions croisées.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaque de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

12.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3 :1) ou du MIT (voir chapitre 4.1)

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention



H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les aérosols.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

12.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 déterminations)

ITALIANO

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 (p.es.)	Via di trasmissione
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasi	Può essere asintomatica Diarrea, dissenteria, dolori addominali, perdita di peso, febbre e altri sintomi che dipendono da posizione della cisti.	Fecale-orale

L'infezione o la presenza di un agente patogeno può essere identificata da:

- Microscopia
- PCR
- Sierologia: p.es. ELISA

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, eparina) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatica qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di Microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della *Entamoeba histolytica*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione IgG:** 1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:** 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 fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 20 mL della Proteina A, con perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1%; pronto all'uso; tappo giallo..
- **Controllo Positivo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:** 1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:** 1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 12.1.

Per le sostanze potenzialmente pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

6.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con antigeni dell'*Entamoeba histolytica*. Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

6.2. Tampone di Lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di Lavaggio 1+19; per esempio. 10 mL del Tampone di Lavaggio + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone di Lavaggio diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

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 di Diluizione del Campione IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di Tampone di Diluizione del Campione IgG e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza alle istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di Lavaggio da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

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

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora $\pm$ 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e 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 > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente ($20...25$ °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20...25$ °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante.

8.1. Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore di assorbanza di questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda di 620 nm come misura di riferimento.

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

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti Istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza $< 0,100$
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza $< 0,200$ e $< \text{Cut-off}$
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza $0,150 - 1,300$
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza $> \text{Cut-off}$

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

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42 = $0,86/2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Risultati in unità [NTU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità NovaTec} = \text{NTU}]$

Esempio: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zona grigia	9 – 11 NTU	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia, il campione viene giudicato come negativo .
Negativo	< 9 NTU	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.
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.		

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	0,611	4,50
#2	24	0,999	9,29
#3	24	1,186	7,78
Interdosaggio	n	Media (NTU)	CV (%)
#1	12	17,99	7,73
#2	12	27,58	11,51
#3	12	3,125	14,26

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analiti specifici.

La specificità diagnostica è 98,0% (95% intervallo di confidenza: 92,96% - 99,76%).

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifica.

La sensibilità diagnostica è 100% (95% intervallo di confidenza: 91,19% - 100%).

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici e itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,5 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

10.5. Reattività incrociata

L'investigazione di un gruppo di campioni con attività di anticorpi contro parametri potenzialmente interferenti non ha rivelato alcuna evidenza di risultati falsamente positivi dovuto a reattività incrociata.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo può alterare i valori delle assorbanze.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- 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 materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- 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 senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

12.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 4.1)

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione



H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

12.2. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 determinazioni)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La *Entamoeba histolytica* es el patógeno más importante de la especie de los rizopodas y se manifiesta como amebiasis. Se distinguen tres formas morfológicas: la forma minuta, la forma magna y los quistes. Las formas minutas viven como parásitos sobre la mucosa y la lumina intestinal formando quistes. Las formas magnas son de 20 a 60 µm de diámetro e se infiltran en los tejidos para multiplicarse. Originalmente contienen un núcleo que se duplica, más tarde se cuadruplica siendo infecciosos.

La infección se produce a través de la ingestión de quistes. Estos evolucionan en formas minutas que se quedan en el intestino donde se multiplican siendo segregadas con las heces. Después de la evolución a la forma magna son capaces de infiltrar tejidos con ayuda de enzimas proteolíticas. Aparte de causar necrosis local pueden desplazarse por vía sanguínea a otros órganos. La situación anatómica predispone con mayor frecuencia la infección del hígado, pero también del bazo, del cerebro, de la piel. Se distinguen tres formas:

- la forma intestinal invasiva de la amebiasis que se manifiesta con diarreas sangrientas-mocosas (formas magnas), lo que causa complicaciones graves por exicosis y cambios de los electrolitos
- la forma intestinal no invasiva asintomática que está diagnosticada por casualidad en un examen de las heces
- la forma extraintestinal (30 % de los casos) con amebas en el hígado donde pueden producir abscesos asociados con una alta letalidad

Las infecciones por *Entamoeba histolytica* se extienden por todo el mundo, más frecuentemente en los países tropicales y subtropicales donde 70 % de la población puede estar infectada (en Europa y norte de América es de 1 %). Se calculan 450 millones de infecciones intestinales en el mundo. La OMS calcula un mínimo de 40 000 muertos al año. El hombre es el único depósito de germen patógeno. Los quistes están segregados con las heces y continúan siendo infecciosos hasta diez días fuera del cuerpo humano. Los principales focos de infección son el agua potable, legumbres crudas y frutas no peladas.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebiasis (amebiasis, entamoebosis)	Puede ser asintomática La diarrea, disentería, dolor abdominal, pérdida de peso, fiebre y otros síntomas dependiendo de la ubicación de los quistes	Oral-fecal

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Microscopia
- PCR
- Serología: p.ej. ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoensayo *Entamoeba histolytica* IgG ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Entamoeba histolytica* en suero o plasma (citratado, heparinado) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placas de Microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Entamoeba histolytica*, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras IgG:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
- **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de proteína A con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), $< 0,1\%$; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígeno de *Entamoeba histolytica*. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo. 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alíquotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras IgG, p.e. 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras IgG, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de 3 hasta 5 y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h $\pm$ 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL de la Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20\ldots 25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µL de Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20\ldots 25^\circ\text{C}$).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación Elisa **al cero** utilizando el **Blanco**.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se pudiese ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción $< 0,100$
- **Control Negativo:** valor de la extinción $< 0,200$ y $< \text{Cut-off}$
- **Control Cut-off:** valor de la extinción $0,150 - 1,300$
- **Control Positivo:** valor de la extinción $> \text{Cut-off}$

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El Cut-off es el valor promedio de la extinción de las determinaciones del Control Cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86:2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10
Cut-off = [NovaTec-unidades = NTU]

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa .
Negativo	< 9 NTU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo gruppado de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisión

Intra-ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,611	4,50
#2	24	0,999	9,29
#3	24	1,186	7,78
Inter-ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
#1	12	17,99	7,73
#2	12	27,58	11,51
#3	12	3,125	14,26

10.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 98,0% (95% Intervalo de confianza 92,96% - 99,76%).

10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 91,19% - 100%).

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

10.5. Reactividad cruzada

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad no dieron falsos positivos debidos a reactividad cruzada.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 determinaciones)

PORTUGUÊS

1. INTRODUÇÃO

A *Entamoeba histolytica* é um parasita anaeróbio que forma quistos com quatro núcleos pequenos e um diâmetro de 10-15 µm. Estes quistos são robustos e resistentes a condições ambientais adversas. Após a ingestão por um hospedeiro susceptível (animais invertebrados e vertebrados, incluindo os seres humanos), forma-se uma pequena abertura na parede quística, através da qual emerge uma ameba. A ameba divide-se serialmente, em três ciclos, dando origem a oito trofozoítos uninucleados a partir de um quisto, móveis e com um diâmetro de 20-30 µm. Alguns dos trofozoítos invadem depois os tecidos do intestino grosso e podem erodi-los a ponto de granjearem acesso à corrente sanguínea. Assim, as amebas podem alcançar todas as partes do corpo. A infecção por *Entamoeba histolytica* está disseminada mundialmente. É o agente causador da amebíase e da disenteria amebiana, e habita no lúmen e nas mucosas do intestino grosso, predominantemente no cólon transverso e no ceco. A amebíase extra-intestinal pode afectar qualquer órgão ou tecido. A maioria dos indivíduos infectados não apresenta sintomas; esta elevada incidência de portadores assintomáticos é uma complicação. Aqueles que apresentam sintomas experimentem um amplo leque de manifestações. Há indivíduos afectados de ambos os sexos e de todos os grupos etários. O risco de infecção aumenta em condições sanitárias inadequadas. Tem-se encontrado uma maior prevalência de amebíase entre trabalhadores agrícolas, cuja actividade os coloca num risco de exposição acrescido, e entre homossexuais masculinos.

Espécies	Doença	Sintomas (p.ex.)	Via de transmissão
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase (disenteria amebica)	Pode ser assintomática Diarreia, disenteria, dor abdominal, perda de peso, febre e outros sintomas, dependendo da localização dos quistos	Oral-fecal

Infecção ou presença de patógeno pode ser identificada por:

- Microscopia
- PCR
- Serologia: p. ex. ELISA

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O *Entamoeba histolytica* IgG ELISA destina-se à determinação qualitativa de anticorpos da classe IgG contra *Entamoeba histolytica* no soro ou plasma (citrito, heparina) humanos.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos específicos é baseado na técnica de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As Placas de Microtitulação são revestidas com antígenos específicos que se ligam os anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligada, um conjugado de peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado se liga aos anticorpos capturados. Num segundo passo de lavagem o conjugado não ligado é removido. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado por adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reacção azul.

A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reacção. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo.

Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotómetro de Placa de Microtitulação ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antígeno de *Entamoeba histolytica*, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **Tampão de Diluição de Amostra IgG:** 1 frasco contendo 100 mL de tampão fosfato (10 mM) para diluição da amostra, pH 7,2 ± 0,2; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solução de Bloqueio:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Tampão de Lavagem (conc. 20x):** 1 frasco contendo 50 mL de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH 7,2 ± 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 20 mL de de Protein A marcados com peroxidase no tampão fosfato (10 mM); de cor azul, pronto a usar; tampa preta.
- **Solução Substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle Positivo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Cut-off:** 1 frasco contendo 3 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde. ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Negativo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 12.1.

Para substâncias potencialmente perigosas verifique a ficha de dados de segurança.

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de uso
- 1 Layout da placa

4.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotômetro de Placa de Microtitulação ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem de Placa de Microtitulação
- Pipetas para dispensar volumes entre 10 e 1000 µL
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo quando armazenado a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) misturá-los antes de iniciar o teste!

6.1. Placa de Microtitulação

As tiras quebráveis são revestidas com antígeno *Entamoeba histolytica*. Imediatamente após a remoção das tiras necessárias, as tiras restantes devem ser lacradas de novo na folha de alumínio juntamente com o saquinho de silício fornecido e armazenar a 2...8 °C.

6.2. Tampão de Lavagem (conc. 20x)

Diluir o Tampão de Lavagem 1+19; por exemplo, 10 mL do Tampão de Lavagem + 190 mL de água destilada. O Tampão de Lavagem diluído é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

6.3. Solução Substrato TMB

A solução está pronta para uso e tem de ser armazenada à 2...8 °C, protegida da luz. A solução deve ser incolor ou poderia ter uma ligeira coloração azul claro. Se o substrato se transforma em azul, pode ter sido contaminado e não pode ser usado no teste.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato, heparina) humanos. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente.

Não é recomendada a inativação por calor das amostras.

7.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 100 com Tampão de Diluição de Amostra IgG. Dispensar 10 µL de amostra e 1 mL de Tampão de Diluição de Amostra IgG em tubos para obter uma diluição 1 + 100 e misturar meticulosamente com um vortex.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de uso **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao as instruções de uso, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três até cinco e o volume do Tampão de Lavagem de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 12. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido no Layout da placa fornecida no kit. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

1. Dispensar 100 µL dos calibradores/controles e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora $\pm$ 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300 µL de Tampão de Lavagem. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!
Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.
5. Dispensar 100 µL de Conjugado em todos os poços, excepto no poço do Branco substrato A1.
6. **Incubar durante 30 min à temperatura ambiente (20...25°C).** Não expor diretamente à luz solar.
7. Repetir a etapa 4.
8. Dispensar 100 µL de Solução Substrato TMB em todos os poços.
9. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25°C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
10. Dispensar 100 µL de Solução de Bloqueio em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a Solução Substrato TMB, desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
11. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição da Solução de Bloqueio.

8.1. Medição

Ajustar o fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA **a zero** usando o **Branco substrato**.

Se - devido à razões técnicas – o fotômetro para Placa de Microtitulação ELISA não puder ser ajustado a zero usando o Branco substrato, valor da absorvância deste deve ser subtraído de todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra no Layout da placa.

É recomendado fazer a medição **dicromática** usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular **os valores médios de absorvância**.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas Instruções de Uso devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **Branco substrato:** Valor de Absorvância **< 0,100**
- **Controle Negativo:** Valor de Absorvância **< 0,200 e < Cut-off**
- **Controle Cut-off:** Valor de Absorvância **0,150 – 1,300**
- **Controle Positivo:** Valor de Absorvância **> Cut-off**

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

9.2. Cálculo dos Resultados

O Cut-off é o valor médio da absorvância das determinações do Controle Cut-off.

Exemplo: Valor da absorvância do Controle Cut-off 0,42 + valor da absorvância do Controle Cut-off 0,44 = 0,86 : 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados em Unidades [NTU]

$$\frac{\text{Valor da absorvância (média) da amostra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades NovaTec} = \text{NTU}]$$

Exemplo:
$$\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$$

9.3. Interpretação dos Resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico estão presente. Houve um contacto com o antígeno (patógeno resp vacina).
Zona cinzenta	9 – 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico não puderam ser claramente detectados. Recomenda-se a repetir o teste com uma amostra fresca em 2 a 4 semanas. Se o resultado estiver novamente dentro da zona cinzenta, a amostra é julgada como negativa .
Negativo	< 9 NTU	A amostra não contém os anticorpos contra o agente patogênico. Um contato prévio com o antígeno (patógeno resp. vacina) é improvável.
O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.		

10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

Para mais informações sobre as características de desempenho específicas, por favor, entre em contato NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisão

Intra-ensayo	n	Promedio (OD)	CV (%)
#1	24	0,611	4,50
#2	24	0,999	9,29
#3	24	1,186	7,78
Inter-ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
#1	12	17,99	7,73
#2	12	27,58	11,51
#3	12	3,125	14,26

10.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico.
É de 98,0% (95% Intervalo de confiança 92,96% - 99,76%).

10.3. Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser positivo na presença do analito específico.
É de 100% (95% Intervalo de confiança: 91,19% - 100%).

10.4. Interferências

Não são observadas interferências com amostras hemolisadas, lipémicas ou ictericas até uma concentração de hemoglobina de 10 mg/mL, de triglicerídeos de 5 mg/mL e de bilirrubina de 0,5 mg/mL.

10.5. Reacção cruzada

A investigação do painel de amostras com atividades de anticorpos em parâmetros com potencial de reação transversal não revelou nenhuma evidencia de resultados falso-positivos devido a reações transversais.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções para utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
 - Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
 - Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
 - Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
 - Não trocar e/ou juntar reagentes ou Placa de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
 - Nenhum reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
 - Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
 - Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
 - Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
 - Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
 - Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
 - Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
 - O ELISA é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo os padrões de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

12.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 4.1)

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar os aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água.
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

12.2. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

Prod. No.: ENTG0140 Entamoeba histolytica IgG ELISA (96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAFIA

Healy, George R. (1971): Laboratory diagnosis of amebiasis. In *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 47 (5), pp. 478–493.

Healy, George R. (1986): Immunologic tools in the diagnosis of amebiasis: epidemiology in the United States. In *Reviews of infectious diseases* 8 (2), pp. 239–246.

Patterson, Marcel; Healy, George R.; Shabot, J. Marc (1980): Serologic testing for amoebiasis. In *Gastroenterology* 78 (1), pp. 136–141.

Petri, William A., Jr; Singh, Upinder (2006): Enteric Amebiasis. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 967–983.

Walsh, Julia A. (1986): Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. In *Reviews of infectious diseases* 8 (2), pp. 228–238.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulación / Placa de Microtitulação
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
CONTROL -	Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle Négatif / Controllo Negativo / Control Negativo / Controle Negativo
CONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle Positif / Controllo Positivo / Control Positivo / Controle Positivo
CUT OFF	Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Contrôle Cut-off / Controllo Cut-off / Control Cut-off / Controle Cut-off
DIL G	IgG Sample Dilution Buffer / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon IgG / Tampone di Diluizione del Campione IgG / Tampón de Dilución de Muestras IgG / Tampão de Diluição de Amostra IgG
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada/ Solução de Bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução Substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					



NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

ENTG0140-2020-04-27-Ka-ab Lot 073