ProSpecT™ DE
Entamoeba histolytica Mikrotiterplatten-Assay

REF R2456048 .....48 Tests
REF R2456096 .....96 Tests

1 ANWENDUNGSBEREICH

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay dient zum qualitativen Nachweis von *E. histolytica*-spezifischen Antigenen (EHSA) in wässrigen Extrakten humaner Stuhlproben. Der Assay erfasst EHSA sowohl von pathogenen als auch nicht pathogenen Stämmen des Organismus.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Entamoeba histolytica ist eine intestinale Amöbe, die nach Ingestion von Zystenformen des Erregers eine Infektion verursacht. Zirka 12 % der Weltbevölkerung ist mit *E. histolytica* infiziert[1,7]. Neunzig Prozent der Betroffenen weisen asymptomatische Infektionen auf und stellen ein enormes Reservoir des Organismus dar. An die 10 % aller Infizierten weisen klinische Symptome auf, die von unspezifischen Symptomen gastrointestinaler Erkrankungen zu Dysenterie, Colitis und Amöbiasis reichen können. Bei geschätzten 2 bis 20 % dieser Infizierten entwickelt sich eine extra-intestinale Invasion und es kommt vor allem in der Leber zur Bildung von Abszessen[1,7].

Die Amöbiasisdiagnose erfolgt herkömmlicherweise durch mikroskopische O&P-Untersuchung (ovum- und parasitologische Untersuchung) des Organismus in Stuhl- oder Gewebeproben. Die Mikroskopie wird aufgrund der fragilen Beschaffenheit der Trophozoiten und der periodisch erfolgenden Ablösung der Lebensformen erschwert. Es hat sich erwiesen, dass auch nach 6 bis 9 O&P-Untersuchungen nur in 72 bis 76 % aller Fälle eine Diagnose gestellt wurde[4]. In einer Studie wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Diagnose nach einer O&P bei einer täglichen Exkretion von 100000 Zysten nur 50 % und bei einer Ausscheidung von 1000 Zysten nur 0,45 % betrug[3]. Es wurden schwerwiegende Probleme aufgrund einer Fehldiagnose von *E. histolytica* dokumentiert[2]. Falsch negative Ergebnisse treten auf, wenn der Parasit von unerfahrenen Labortechnikern nicht erfasst wird; falsch positive Ergebnisse kommen vor, wenn Leukozyten, andere Amöben, Blutzellen oder Rückstände fälschlicherweise als *E. histolytica* identifiziert werden[2].

Bei extra-intestinaler Amöbiasis kann es vorkommen, dass Organismen nicht im Stuhl ausgeschieden werden und zur Diagnosefindung serologische Tests erforderlich sind. Bei serologischen Tests können jedoch Probleme auftreten, wenn die Antikörpertiterwerte niedrig oder schwer interpretierbar sind. In endemischen Bereichen erschwert die hohe Prävalenz der Seropositivität die Diagnose einer vorliegenden Infektion. Asymptomatische Zystenausscheider können negative serologische Ergebnisse aufweisen[1]. Außerdem erschwert die langfristig nach der Infektion anhaltende Antikörperpersistenz die Unterscheidung zwischen derzeitiger und vergangener Infektion.

Die Vermehrung von *E. histolytica* im Darmtrakt führt zur Erzeugung spezifischer Antigene (EHSA), die in den Stuhlproben infizierter Personen auffindbar sind. EHSA lassen sich mit nur einer Stuhlprobe nachweisen (verglichen zu mehreren für O&P erforderlichen Stuhlproben). Der Nachweis der EHSA eliminiert die allgemein bekannten Diagnoseprobleme wie z. B. Fehlidentifizierung, Falscherkennung der Organismen sowie der persistenten oder abwesenden Antikörpertiter. Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay dient zum Nachweis von EHSA.

3 GRUNDLAGEN DES TESTS

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay ist ein Immunoassay fester Phase zum Nachweis von EHSA[6].

Verdünnte Stuhlproben werden in die abgebrochenen Vertiefungen gegeben, die mit Anti-EHSA-Antikörpern beschichtet sind. Wenn EHSA vorhanden ist, wird es vom gebundenen Antikörper „eingefangen“. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Das Enzymkonjugat (Anti-EHSA-Antikörper, markiert mit Meerrettich-Peroxidase-Enzym) wird hinzugefügt. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Enzymkonjugat zu entfernen. Bei einer positiven Reaktion bindet EHSA das Enzymkonjugat an die Vertiefung. Das Substrat für das Enzym, 3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidin (TMB), wird hinzugegeben und es bildet sich ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Farbentwicklung kann visuell oder mit einem Spektrophotometer ausgewertet werden. Bei einer negativen Reaktion ist kein EHSA bzw. eine unzureichende Konzentration an EHSA zur Bindung des Enzymkonjugats vorhanden und es wird kein farbiges Reaktionsprodukt gebildet.

4 SYMBOLDEFINITIONEN

REF	Katalognummer
IVD	In-vitro-Diagnostikum
Σ	Inhalt ausreichend für <n> Tests
i	Gebrauchsanweisung beachten
8°C 2°C	Temperaturbeschränkung (Lagertemp.)
LOT	Chargennummer (Losnummer)
⌛	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Hersteller
DILUTED SAMPLE	Verdünnte Probe

5 INHALT DES KITS, VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay enthält genügend Reagenzien für die Durchführung von Σ 48 oder Σ 96 Tests.
Siehe auch **Vorsichtsmaßnahmen** in Abschnitt **6**.

Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem Verpackungsetikett vermerkt.

Alle Komponenten bei 2 - 8 °C lagern.

Vor dem Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Unverbrauchte Reagenzien im Kühlschrank aufbewahren.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden die Reagenzien in der erforderlichen Konzentration geliefert. Die Reagenzien können direkt von den Tropfflaschen getropft oder zwecks Verwendung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz muss entsorgt werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz nicht wieder in die Flasche füllen.

i — **Gebrauchsanweisung**
Vollpipetten
Teststreifenhalterung und Abdeckung
Kurzanleitung

MICROTITRATION PLATE — **Mikrotiterplatte*** (8 Vertiefungen/ Streifen)
6 Streifen (R2456048) oder 12 Streifen (R2456096) beschichtet mit Anti-EHSA-Antikörpern vom Hase. Unverbrauchte Teststreifen im Beutel mit Trockenmittel lagern, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.

CONJUGATE — **Enzymkonjugat***
Eine Tropfflasche mit 12 ml (R2456048) oder 25 ml (R2456096) meerrettich-peroxidase-markiertem Anti-EHSA (Hase) in einer Proteinmatrix mit Serumalbumin (Rind) mit antimikrobiellen Mitteln

CONTROL + — **Positivkontrolle**
Eine Tropfflasche mit 4 ml gereinigtes EHSA in einer Proteinmatrix mit antimikrobiellen Mitteln

CONTROL – — **Negativkontrolle**
Eine Tropfflasche mit 4 ml Proteinmatrix, rotem Farbstoff und antimikrobiellen Mitteln

SAMPLE DILUENT — **Probenverdünnungspuffer**
Eine Flasche mit 120 ml gepufferter Lösung mit Hasenserum, rotem Farbstoff und antimikrobiellen Mitteln

WASH BUFFER (x10) — **Waschpuffer**
Eine Flasche mit 120 ml einer (10 fach) konzentrierten Pufferlösung mit antimikrobiellen Mitteln.

Das 10 fach-Waschpufferkonzentrat durch die Zugabe von 1 Teil Konzentrat auf 9 Teile destilliertes oder deionisiertes Wasser auf einfache Stärke verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2 - 8 °C einen Monat lang stabil.

SUBSTRATE TMB — **Farbsubstrat**
Eine Tropfflasche mit 12 ml (R2456048) bzw. 25 ml (R2456096) 3,3’,5,5’-Tetramethyl-benzidin (TMB) in Puffer.

Das Farbsubstrat sollte in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wird, aufbewahrt und daraus ausgegeben werden. Wenn aus einem beliebigen Grund ein Aliquot aus der Flasche entnommen wird, das unbenutzte Farbsubstrat nicht wieder in die ursprüngliche Flasche füllen.

STOP SOLUTION — **Stopplösung**
Eine Tropfflasche mit 12 ml Schwefelsäure (0,46 mol/l)

***Hinweis:** Die Reagenzien von Kits verschiedener Chargennummern dürfen nicht vertauscht werden.

6 VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD

Reagenzien nur für den *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch.

Nur für die professionelle Verwendung.

Informationen zu potenziell gefährlichen Komponenten dem Sicherheitsdatenblatt oder der Produktkennzeichnung entnehmen.

GESUNDHEITS- UND SICHERHEITSINFORMATIONEN

6.1 Die Reagenzien werden aus Biomaterial hergestellt und müssen als potenziell infektiös gehandhabt werden. Die Entsorgung muss unter Einhaltung entsprechender Verfahren für infektiöses Material („Biohazard“) durchgeführt werden.

6.2 Nicht mit dem Mund pipettieren. Bei der Handhabung von Proben und der Durchführung des Tests Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Danach die Hände gründlich waschen.

6.3 Die Proben können potenziell infektiöse Mittel enthalten und müssen unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 („Biosafety Level 2“) entsprechend des CDC/NIH-Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical laboratories“, 5. Ausgabe, gehandhabt werden.

6.4 Waschpuffer enthält Hautreizstoffe (<1 % v/v). Hautkontakt vermeiden. Einweg-Schutzhandschuhe aus Vinyl oder Nitril tragen.

6.5 Den benutzten Waschpuffer in entsprechenden Behältern für infektiöses Material („Biohazard“) entsorgen.

ANALYTISCHE VORSICHTSMAßNAHMEN

6.6 Alle in dieser Gebrauchsanweisung enthaltenen Anweisungen sorgfältig durchlesen und befolgen.

6.7 Mit Ausnahme des Waschpufferkonzentrats werden alle Reagenzien in Arbeitskonzentration geliefert. Reagenzien nur verdünnen, wenn ausdrücklich angewiesen.

6.8 Nicht nach dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum verwenden. Die Verwendung von Reagenzien nach dem Verfallsdatum kann die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.

6.9 Die folgenden allgemeinen Reagenzien können in der ProSpecT-Serie produktübergreifend verwendet werden: Waschpuffer, Farbsubstrat und Stopplösung.

6.10 Durch eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien kann die Testgenauigkeit vermindert werden. Beim Entnehmen von aliquoten Teilen aus den Reagenzflaschen sterile Einwegpipetten verwenden, um eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien zu vermeiden.

6.11 Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) bringen.

6.12 Teststreifen im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel lagern, um die Vertiefungen vor Feuchtigkeit zu schützen.

6.13 Die Stuhlproben müssen vor der Verarbeitung der Probe gründlich gemischt werden, um eine genaue Darstellung der Probe sicherzustellen. DIE PROBEN VOR DEM TEST NICHT KONZENTRIEREN.

6.14 Das Farbsubstrat ist lichtempfindlich. Wenn das Reagenz Licht ausgesetzt wird und Farbe entwickelt, muss es entsorgt werden.

6.15 Bediener, die an Farbenblindheit oder anderen Sehschwächen leiden, können das Testergebnis nicht visuell ablesen und sollten die Messergebnisse mithilfe des Spektrophotometers auswerten.

6.16 Reagenzien während des gesamten Verfahrens in der gleichen Reihenfolge in die Vertiefungen pipettieren. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen nicht mit den Tropföffnungen berühren, um Kontaminierung zu vermeiden.

6.17 Die Inkubationszeit genau einhalten. Nach dem Hinzufügen des Reagens in die letzte Vertiefung auf jeder zu testenden Mikrotiterplatte die Zeitmessung starten. Nie mehr als drei Platten mit jeweils 96 Vertiefungen gleichzeitig bearbeiten, um die genaue Zeitmessung sicherzustellen. Abweichungen von diesem Testverfahren können die Testergebnisse beeinträchtigen.

6.18 Es ist wichtig, dass die Tropfflasche senkrecht gehalten wird und der Tropfen sich an der Spitze bildet. Falls die Spitze nass wird, bildet sich ein Tropfen mit dem falschen Volumen um das Ende herum und nicht an der Spitze. In diesem Fall vor dem Fortfahren die Spitze trocknen.

7 GEWINNUNG VON STUHLPROBEN

Stuhlproben, die konzentriert oder in 10 % Formalin mit SAF- oder PVA-Fixiermitteln behandelt wurden, sind nicht geeignet.

FRISCH: Unkonservierte Stuhlproben sind in sauberen, leckgeprüften Kunststoffbehältern zu sammeln. Proben können 48 Stunden bei 2 - 8 °C gelagert und in diesem Zeitraum getestet werden.

GEFROREN: Wenn Stuhlproben nicht innerhalb von 48 Stunden getestet werden können, sollten sie bei -20 bis -70 °C eingefroren werden.

CARY BLAIR: In Cary Blair-Transportmedien gewonnene Stuhlproben sollten bei 2 - 8 °C gekühlt und innerhalb einer Woche nach der Gewinnung verarbeitet werden.

8 TESTDURCHFÜHRUNG

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN

Siehe **Inhalt** in Abschnitt **5.**

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

Behälter für die Entnahme von Stuhlproben
Stoppuhr zum Messen von Minuten
Waschflasche für Waschpuffer
Destilliertes oder deionisiertes Wasser

OPTIONALE MATERIALIEN (NICHT MITGELIEFERT)

Lesegerät für Mikrotiterplatten, das 450 nm oder 450/620 bis 650 nm messen kann
Abstrichtupfer mit Baumwoll- oder Rayonspitze
Mikropipette für Volumen bis 200 µl
Einwegröhrchen aus Kunststoff oder Glas
Vortexmischer mit Plattenadapter oder Plattenschüttler

TESTVERFAHREN

8.1 **Probenvorbereitung für den Test:**
Es sind Verdünnungen im Verhältnis 1:10 v/v jeder Stuhlprobe herzustellen.

1. Gefrorene Stuhlproben auftauen. Die Stuhlproben sind durch kräftiges Schütteln oder Vortexen gut zu emulgieren, so dass eine gleichmäßige Verteilung des Antigens gegeben ist.
2. Die erforderliche Anzahl von Teströhrchen mit der Patientenkennung versehen.
3. In jedes Röhrchen **1 ml** Probenverdünnungspuffer pipettieren oder zugeben.
4. Bei festen oder halbfesten Proben **einen Abstrichtupfer** verwenden, der durchgehend mit Stuhl bedeckt ist. Bei flüssigen Proben **3 Abstrichtupfer oder 300 µl** verwenden.
5. Den/die Abstrichtupfer mehrere Male im Probenverdünnungspuffer drehen, um das Stuhlmaterial in der Lösung zu suspendieren. Danach den/die Abstrichtupfer fest gegen die Fläschchenseite rollend andrücken, um so viel Flüssigkeit wie möglich herauszudrücken. Die Abstrichtupfer danach vorschriftsmäßig entsorgen. Bereits vorbereitete Stuhlproben können im Probenverdünnungspuffer bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) bis zu 8 Stunden oder bei 2 - 8 °C bis zu 48 Stunden im Kühlschrank gelagert werden und sollten dann getestet werden.

8.2 Den Beutel öffnen, die erforderliche Anzahl von Teststreifen entnehmen und in einen Teststreifenhalter geben. Eine Vertiefung für die Negativkontrolle und eine weitere für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Vertiefungen benötigt werden, die erforderliche Anzahl von Vertiefungen abbrechen und die nicht benötigten Vertiefungen wieder in den Beutel mit Trockenmittel geben. DEN BEUTEL WIEDER FEST VERSCHLIESSEN, UM DEN INHALT VOR FEUCHTIGKEIT ZU SCHÜTZEN UND IM KÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN.

8.3 Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Negativkontrolle, Positivkontrolle oder verdünnte Patientenprobe in die einzelnen Vertiefungen geben. Dabei vorsichtig vorgehen, um keine benachbarten Vertiefungen zu kontaminieren. Die Kontrollen können direkt aus der Tropfflasche in die jeweils vorgesehene Vertiefung gegeben werden oder es können, wenn dies gewünscht wird, 200 µl aus der Flasche pipettiert werden.

8.4 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **60 Minuten** lang inkubieren. Mit der Zeitmessung nach dem Hinzufügen der letzten Stuhlprobe beginnen.

8.5 Den Inhalt durch Schütteln oder Absaugen aus den Vertiefungen entfernen. Alle Vertiefungen mit **verdünntem** Waschpuffer (~350 bis 400 µl pro Vertiefung) gründlich waschen. Nach jedem Waschen alle Flüssigkeiten aus den Vertiefungen ausschütten oder aspirieren. Insgesamt **3 Mal** waschen. Den Inhalt der Platte nach dem letzten Waschvorgang durch Ausklopfen auf sauberem Papier oder Absaugen entfernen. So viel Waschpuffer wie möglich entfernen. Die Vertiefungen dürfen jedoch niemals vollkommen trocken sein.

8.6 Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Enzymkonjugat in die Vertiefungen geben.

8.7 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **30 Minuten** lang inkubieren.

8.8 Vertiefungen **5 Mal** ausschütteln oder absaugen und waschen (siehe Schritt 8.5).

8.9 Jeweils **4 Tropfen** (200 µl) Farbsubstrat in die Vertiefungen geben.

8.10 Die Mikrotiterplatte **abdecken** und bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) **10 Minuten** lang inkubieren.

8.11 Jeweils **1 Tropfen** (50 µl Stopplösung in die Vertiefungen geben. Vorsichtig auf die Vertiefungen klopfen oder diese vortexen, bis ein gleichmäßiger gelber Farbton entsteht. Die Messergebnisse innerhalb von **10 Minuten** nach dem Hinzufügen der Stopplösung ablesen.

8.12 Ergebnisse visuell oder bei 450 nm (eine Wellenlänge) oder 450/620 bis 650 nm (zwei Wellenlängen) spektrophotometrisch bestimmen.

9 QUALITÄTSKONTROLLE

Positiv- und Negativkontrollen müssen bei jeder Testdurchführung hinzugegeben werden. Die Positiv- und Negativkontrollen dienen sowohl als Reagenzien als auch als Verfahrenskontrollen. Die Kontrollen sollen die Reagenzien auf erhebliche Fehler hin überwachen. Die Positivkontrolle ist nicht in der Lage, die Präzision am Cut-off-Wert zu gewährleisten.

Die optische Dichte (O.D.) der Negativkontrolle sollte ≤ 0,100 bei 450 nm oder < 0,070 bei 450/620 bis 650 nm betragen. Die Negativkontrolle sollte beim visuellen Ablesen farblos sein. Wenn in der Negativkontrolle eine gelbe Färbung vorliegt, die 1+ oder höher auf der Kurzanleitung entspricht, muss der Test unter genauer Einhaltung des Waschverfahrens wiederholt werden.

Die optische Dichte der Positivkontrolle muss ≥ 0,300 bei 450 nm oder 450/620 bis 650 nm betragen, nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde, und muss beim visuellen Ablesen größer oder gleich der 2+ Reaktion sein. Wenn die gelbe Färbung in der Positivkontrolle geringer als 2+ der Kurzanleitung ist, technische Unterstützung hinzuziehen.

10 ERGEBNISSE

Für Farbauswertung siehe beigefügte Kurzanleitung.

VISUELL

10.1 Die Testergebnisse durch Vergleichen mit den Reaktionsfarben der Kurzanleitung ablesen.
Positiv: gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+
Negativ: farblos

10.2 Auswertung der visuellen Ergebnisse:
Positiv: Wenn sich in der Testvertiefung eine gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+ entwickelt, enthält die Probe EHSA und der Test ist positiv.
Hinweis: Tests mit blassgelber Färbung (weniger als 1+) müssen wiederholt werden.
Negativ: Eine farblose Reaktion ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein oder eine nicht messbare Konzentration an EHSA in der getesteten Probe vorhanden ist.

SPEKTROPHOTOMETRISCH

10.3 Das Ergebnis entweder bei einer Wellenlänge (450 nm) oder bei zwei Wellenlängen (450/620 bis 650 nm) ablesen.

10.4 Die optische Dichte für die Negativkontrolle ablesen.

10.5 Die optische Dichte der Vertiefung mit der Negativkontrolle von der optischen Dichte der Vertiefung der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.
Hinweis: Das Lesegerät kann so eingestellt werden, dass für die Vertiefung der Negativkontrolle ein Leerwert bestimmt wird. Dadurch wird die optische Dichte von der Vertiefung mit der Negativkontrolle automatisch von allen anderen Messwerten subtrahiert. Wenn das Lesegerät nicht über diese Funktion verfügt, den Leerwert gegen Luft bestimmen und die optische Dichte der Vertiefung mit der Negativkontrolle von den optischen Dichten der Vertiefung mit der Positivkontrolle und den Testvertiefungen subtrahieren, bevor die Ergebnisse ausgewertet werden.

10.6 Ablesen der Testergebnisse:
Positiv: Optische Dichte ≥ 0,050 gegen Leerwert
(d. h. nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde)
Negativ: Optische Dichte < 0,050 gegen Leerwert
(d. h. nachdem die optische Dichte der Negativkontrolle subtrahiert wurde)

10.7 Auswertung der spektrophotometrischen Ergebnisse:
Positiv: Wenn die gegen den Leerwert bestimmte optische Dichte in der Testvertiefung größer oder gleich 0,050 ist, enthält die Probe EHSA und der Test ist positiv.
Negativ: Eine gegen den Leerwert bestimmte optische Dichte von unter 0,050 ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein oder eine nicht messbare Konzentration an EHSA in der getesteten Probe vorhanden ist.
***Hinweis:** Alle Vertiefungen, die visuell klar aussehen, aber eine optische Dichte ergeben, die mit der visuellen Auswertung nicht übereinstimmt, sind als abweichende Werte zu betrachten. Die Vertiefung sollte auf Blasen, kleine Partikel oder einen undurchsichtigen Film auf dem Boden der Vertiefung untersucht werden. Zum Entfernen

des Films die Unterseite der Vertiefungen abwischen und die optische Dichte erneut ablesen. Wenn die Diskrepanz zwischen visuellen und spektrophotometrischen Werten fortbesteht, den Test wiederholen.

11 GRENZEN DER METHODE

Die Gültigkeit der Ergebnisse, die mit dem ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay erhalten werden, hängt vom Verlauf der Kontrollreaktionen ab. Siehe **Qualitätskontrolle** in Abschnitt **9**.

Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit des Vorhandenseins von *Entamoeba histolytica* nicht aus; dieser Fall kann eintreten, wenn die Antigenkonzentration in der Probe unterhalb des messbaren Bereichs des Tests liegt. Eine Korrelation zwischen der Antigenmenge in einer Probe und der klinischen Darstellung konnte nicht nachgewiesen werden.

Wie bei allen diagnostischen In-vitro-Tests sind die Ergebnisse zusammen mit den klinischen Befunden und/oder anderen Labortests zu interpretieren.

Die korrekte Gewinnung und Verarbeitung der Stuhlprobe sind für die optimale Testdurchführung von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden von Stuhlproben erzielt, die möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Siehe **Gewinnen von StuhlProben** in Abschnitt **7**.

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay wurde als High-Complexity-Test klassifiziert.

12 ERWARTETE WERTE

Geschätzte 12 % der Weltbevölkerung sind mit *Entamoeba histolytica* infiziert[1]. Der Großteil dieser Infektionen ist asymptomatisch, aber an die 10 % aller Infizierten weisen klinische Symptome auf, die von unspezifischen Symptomen gastrointestinaler Erkrankungen zu Dysenterie, Colitis und Amöbiasis reichen können[1]. In den USA werden den Gesundheitsämtern (CDC, Centres for Disease Control) durchschnittlich 3500 Amöbiasisfälle pro Jahr gemeldet[2]. Allgemein anerkannte hoch gefährdete Bevölkerungsgruppen sind u.a. Reisende, Immigranten, Gast- bzw. Wanderarbeiter, immungeschwächte Personen, psychisch kranke Patienten und sexuell aktive männliche Homosexuelle[1]. Bei männlichen Homosexuellen ist der nicht pathogene Stamm des Organismus vorherrschend[5]. Asymptomatische Träger pathogener Stämme stellen ein bedeutendes Reservoir für die weitere Übertragung dar[1].

13 LEISTUNGSDATEN

SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Die Leistung des ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assays (EIA) wurde mittels 268 frischen und gefrorenen Stuhlproben ermittelt. Ein großes klinisches Referenzlabor stellte 105 Proben bereit, die mittels O&P-Untersuchung positiv auf *E. histolytica* getestet wurden. Diese Proben wurden gefroren und ~2 bis 3 Jahre gelagert, bevor sie mittels Mikrotiterplatten-Assay getestet wurden. Von diesen Proben waren gemäß O&P und EIA 91 positiv und gemäß EIA 14 negativ.

Bei 163 frischen, gefrorenen Proben ergab die O&P von *E. histolytica* ein negatives Ergebnis. Diese Proben waren ~6 Monate gelagert worden. 48 davon enthielten neben *E. histolytica* noch weitere Parasiten. Alle diese 48 Proben wurden mittels EIA negativ auf *E. histolytica* getestet. Die restlichen 115 Proben enthielten gemäß O&P keine Parasiten; 114 waren gemäß EIA negativ und eine war positiv.

Die Leistungsdaten des ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assays sind im Folgenden zusammengefasst. Die tatsächliche Sensitivität des Assay ist eventuell noch höher als angegeben, da das Vorkommen falsch positiver O&P-Identifizierungen gut belegt ist[2].

		O&P +	O&P -	
ProSpecT	+	91	1	
Entamoeba histolytica	-	14	162	
		105	163	268

Sensitivität = 87 %
Spezifität = 99 %
Positiver Vorhersagewert = 99 %
Negativer Vorhersagewert = 92 %

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assay ermöglicht den Nachweis von ungefähr 40 ng/ml EHSA.

REPRODUZIERBARKEIT

Der Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK, Lauf zu Lauf) des ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiterplatten-Assays wurde ermittelt, indem vier positive Proben mit unterschiedlichen optischen Dichten ausgewählt wurden. Jede Probe wurde an 5 aufeinander folgenden Tagen in 8 Vertiefungen pro Tag getestet. Der durchschnittliche Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 4,8 %.

Probe	Mittlere OD	Standardabweichung	VK (%)
1	0,950	0,0210	2,20
2	0,620	0,0143	2,30
3	0,450	0,0355	7,90
4	0,260	0,0179	6,90

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient (innerhalb eines Laufs) wurde bestimmt, indem 4 positive Proben in jeweils 24 Vertiefungen getestet wurden. Der mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizient betrug 3,4 %.

Probe	Mittlere OD	Standardabweichung	VK (%)
1	1,086	0,0242	2,23
2	0,685	0,0242	3,54
3	0,481	0,0207	4,31
4	0,289	0,0100	3,50

KREUZREAKTIVITÄT

Der ProSpecT Entamoeba histolytica-Mikrotiter-Assay wurde mit Stuhlproben getestet, die für eine Reihe fäkaler Parasiten mittels O&P als positiv bewertet wurden. Mit keiner der unten aufgelisteten infektiösen Agenzien konnten Kreuzreaktionen beobachtet werden.

Ascaris lumbricoides (4)	Hakenwurm (1)
Blastocystis hominis (5)	*Hymenolepis nana* (1)
Chilomastix mesnili (1)	*Iodamoeba butschlii* (1)
Cryptosporidium parvum (6)	*Isospora spp.* (2)
Dientamoeba fragilis (5)	*Strongyloides stercoralis* (2)
Endolimax nana (4)	*Taenia spp.* (1)
Entamoeba coli (4)	*Trichuris hominis* (2)
Entamoeba hartmanni (2)	*Trichuris trichiura* (4)
Giardia lamblia (5)	

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der getesteten Proben an.

14 LITERATURVERWEISE

1. **Bruckner, D.A., 1992.**
Amoebiasis.
Clin. Microbiol. Rev. 5(4):356-369.

2. **Krogstad, D.J., H.C. Spencer, G.R. Healy, N.N. Gleason, D.J. Sexton, C.A. Herron. 1978.**
Amoebiasis: Epidemiologic Studies in the United States, 1971-1974.
Ann. Int. Med., 88:89-97.

3. **Marsden, A.P.H. and H.F. Smith, 1946.**
The detection of the cysts of *E. histolytica* in the faeces by microbiology examinations.
Med. J. Ant:II, 915-919.

4. **Stamm, W. P., 1957.**
The Laboratory Diagnosis of Clinical Amoebiasis.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 51:306-312.

5. **Tannich, E. and G.D. Burchard, 1991.**
Differentiation of Pathogenic from Nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by Restriction Fragment Analysis of a Single Gene Amplified In Vitro.
J. Clin. Microbiol., 29(2):250-255.

6. **Tijssen, P., 1985.**
Practice and Theory of Enzyme Immunoassays.
Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, eds., Elsevier, N.Y. Seiten. 14-16.

7. **Walsh, J.A., 1986.**
Problems in Recognition and Diagnosis of Amoebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality.
Rev. Inf. Dis. 8(2):228-238.

ProSpecT™ ist eine eingetragene Marke von Remel Inc.

Oxoid Ltd Wade Road Basingstoke Hants, RG24 8PW, GB

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an Ihren Händler.

Gebrauchsanweisung X7592B, überarbeitet Februar 2013