

MegaELISA® ENCEPHALITOZOON cuniculi ad us. vet.

Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis
von IgG-Antikörpern gegen *Encephalitozoon cuniculi*
im Plasma oder Serum des Kaninchens

In vitro Diagnostikum

GEBRAUCHSINFORMATION

Enzyme immunoassay for the qualitative detection
of IgG antibodies against *Encephalitozoon cuniculi*
in plasma or serum of the rabbit

In vitro diagnosticum

INSTRUCTIONS FOR USE

Art. No. 825048EK1 (48's)
825096EK1 (96's)

Hersteller/Manufacturer:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📄 (+43) 5573 85400-4
✉ info@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® ENCEPHALITOZOON cuniculi

ad us. vet.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	3
2. Verwendungszweck	3
3. Testprinzip	3
4. Testkitkomponenten	4
5. Haltbarkeit und Lagerung	5
6. Informationen zum Probenmaterial	6
7. Testvorbereitung	6
8. Testdurchführung	7
9. Testauswertung	9
10. Leistungsmerkmale	10
11. Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise	10
12. Haftung	11
13. Kurz-Protokoll MegaELISA® ENCEPHALITOZOON cuniculi	12
Abkürzungen	24

Contents	Page
1. Introduction	13
2. Intended use	13
3. Test principle	13
4. Test-kit components	14
5. Stability and Storage	15
6. Information on the sample material	15
7. Test preparation	16
8. Test procedure	17
9. Test evaluation	18
10. Features of performance	19
11. Safety measures and precautions	19
12. Liability	20
13. Short protocol MegaELISA® ENCEPHALITOZOON cuniculi	21
Abbreviations	24

1. EINLEITUNG

Die Infektion mit *Encephalitozoon cuniculi* erfolgt über Sporen im Urin infizierter Tiere. Die Aufnahme der extrem umweltresistenten Sporen geschieht meist peroral durch kontaminiertes Futter oder Inhalation in kontaminierter Umgebung, weswegen die Verbreitung bei Haus- und Labortieren deutlich schneller geschieht als bei wilden Tieren. Karnivoren können durch infizierte Beute ebenfalls infiziert werden.

Aufgrund von Läsionen im zentralen Nervensystem, der Niere und im Auge können neurologische Symptome, Anzeichen für Nierenversagen und Augenhautentzündungen auftreten. Erkrankte Kaninchen können von einzelnen oder mehreren dieser Symptome betroffen sein. Am häufigsten ist das sogenannte Vestibularsyndrom (Kopfschiefhaltung, Störungen der Bewegungskoordination und Augenzittern). Weitere neurologische Symptome können unter anderem Krampfanfälle, unvollständige Lähmungen und Gleichgewichtsverlust sein. In seltenen Fällen können auch erhöhte Aggression und der Verlust von Hör- oder Sehvermögen auftreten. Bei einigen Tieren kann eine Niereninsuffizienz mit eher unspezifischen Symptomen (Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Dehydratation, Störungen des Mineralhaushaltes und Knochenstoffwechsels sowie Apathie) hinweisend sein.

Die *in vivo*-Diagnose von Encephalitozoonose bei Kaninchen ist problematisch aufgrund der hohen Anzahl an Tieren mit einer chronischen, asymptomatischen Infektion. In diesem Fall können Antikörper über Jahre hinweg im Blut nachgewiesen werden. Der serologische Nachweis von Antikörpern gegen *E. cuniculi* ist in der Regel die sensitivste Methode, eine Infektion zu bestimmen, ein negativer Antikörpertiter während dieses Zeitraums schließt normalerweise eine Infektion mit *E. cuniculi* aus.

Der **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** basiert auf hochspezifischen *E. cuniculi*-Antigenen für den schnellen und zuverlässigen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Encephalitozoon cuniculi* im Plasma oder Serum infizierter Kaninchen.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Encephalitozoon cuniculi* im Plasma oder Serum des Kaninchens.

3. TESTPRINZIP

Der **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** ist ein qualitativer Immunoassay-Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Encephalitozoon cuniculi* im Sandwich-Prinzip. An der Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind spezifische *Encephalitozoon cuniculi*-Antigene gebunden. Eine Verdünnung des zu untersuchenden Kaninchenplasmas oder -serums bzw. die Kontrollen werden zur Inkubation bei Raumtemperatur (20–25 °C) in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach einem Waschschrift wird Anti-Kaninchen IgG-Konjugat, markiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), dazuge-

geben und bei Raumtemperatur (20–25°C) inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wird in einem weiteren Waschschritt entfernt. Nach der Zugabe von Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) wandelt gebundenes Enzym bei positiven Proben die farblose Lösung in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte in eine blaue Lösung um. Durch Zugabe von Stopp-Reagenz (Schwefelsäure) erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der in der Probe vorhandenen *Encephalitozoon*-spezifischen IgG-Antikörper.

4. TESTKITKOMPONENTEN

4.1. MITGELIEFERTE TESTKITKOMPONENTEN / REAGENZIEN

Die Reagenzien einer Packung reichen für 48 bzw. 96 Bestimmungen.

Inhalt	48er Kit	96er Kit
1. Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen im Halterahmen mit je 8 Bestimmungen, beschichtet mit <i>Encephalitozoon cuniculi</i> -Antigenen	6 teilbare Streifen	12 teilbare Streifen
2. Probenverdünnungspuffer (PVP, pH 7,2 ± 0,2, enthält 0,045 % ProClin® 300), gebrauchsfertig, blaue Kappe	25 ml	50 ml
3. Waschpuffer (10× TRIS-Puffer, pH 7,2 ± 0,2, enthält 0,045 % ProClin® 300), weiße Kappe	25 ml	50 ml
4. Positivkontrolle (enthält 0,045 % ProClin® 300), gebrauchsfertig, rote Kappe	0,5 ml	1 ml
5. Negativkontrolle , (enthält 0,045 % ProClin® 300), gebrauchsfertig, blaue Kappe	0,5 ml	1 ml
6. Konjugat (Peroxidase-konjugierte Anti-Kaninchen IgG-Antikörper, pH 7,2 ± 0,2, enthält 0,045 % ProClin® 300), gebrauchsfertig, weiße Kappe	6 ml	12 ml
7. Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin [TMB]/H ₂ O ₂), gebrauchsfertig, gelbe Kappe. Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen!	6 ml	12 ml
8. Stopp-Reagenz (0,2 M Schwefelsäure), gebrauchsfertig, rote Kappe	8 ml	15 ml
9. Folie zum Abdecken	1	1
10. Evaluationsblatt	1	1
11. Gebrauchsinformation	1	1

4.2. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTER REAGENZIIEN / ZUBEHÖR

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Einmal-Probenröhrchen
- Laborpipette (5–100 µl, 1 ml)
- Vortex-Mixer
- Filterpapier/Labortücher
- Messzylinder (1000 ml)
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter 620 nm)
- Abfallbehälter mit einer 0,5%-igen Hypochloritlösung

5. HALTBARKEIT UND LAGERUNG



Lagerung
2–8 °C

2–8 °C



Verwendbar bis
– siehe Etikett



Für den tierärztlichen
Gebrauch

LOT

Chargen-Bezeichnung



For research only



Keine Reagenzien
verschiedener Testkits,
Chargennummern oder
mit abgelaufenem Ver-
fallsdatum verwenden.



Gebrauchsinformation
genau beachten

Mikrobielle Kontamination der Reagenzien ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Bei Öffnung des verschweißten Aluminiumbeutels der Mikrotiterplatte ist darauf zu achten, dass der wiederverschließbare Klippverschluss nicht beschädigt oder gar abgetrennt wird! Die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen, die restlichen sofort wieder in den Beutel geben, verschließen und bei 2–8 °C lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das leicht hellblaue Substrat ist unbedingt zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden (Funktionsunfähigkeit)!

6. INFORMATIONEN ZUM PROBENMATERIAL

- Nur Kaninchen-Plasma oder Serum verwenden!
- Das Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Originale Proben, sprich unverdünntes Plasma oder Serum, sollten ungekühlt (20–25°C) innerhalb von 4 Stunden getestet werden! Bei 2–8°C kann das unverdünnte Plasma oder Serum bis max. 5 Tage gelagert werden.
- Plasma oder Serum laut Probenvorbereitung 1+600 im Probenverdünnungspuffer verdünnt (vgl. „7.3. Probenvorbereitung“, S. 7), kann für Testungen im **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON** cuniculi gelagert werden: ungekühlt bei Raumtemperatur sind die Proben-Puffer-Mischungen (PPM) bis zu 28 Tage stabil, bei 2–8°C sind sie bis zu 2 Monate stabil, bei –20°C können sie dauerhaft gelagert und bis zu 10× aufgetaut und eingefroren werden.

ACHTUNG: Diese Angaben beziehen sich ausschließlich auf den Einsatz der Proben im **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON** cuniculi und auf die Stabilität der *Encephalitozoon* IgG-Antikörper in der PPM, dies gilt nicht für andere Parameter!

- Nicht hitze-inaktivieren.
- Beachten Sie, dass das Probenmaterial, ebenso wie alle verwendeten Testkitkomponenten, zum Zeitpunkt der Anwendung Raumtemperatur haben sollte.
- **ACHTUNG:** Unvollständig gefüllte und/oder unzureichend durchmischte EDTA-, Citrat- oder Heparinröhrchen können Störeffekte verursachen, die zu unterschiedlichen Testergebnissen führen können.

7. TESTVORBEREITUNG

! Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsinformation genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

7.1. ALLGEMEINES

- Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Aluminiumbeutel zu entnehmen. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten empfiehlt es sich, diese abzudecken oder abzukleben.
- Die Reagenzien sind unmittelbar vor ihrer Verwendung gut zu vermischen.
- Nach Gebrauch sind sowohl die nicht verwendeten Mikrotiterstreifen (im verschlossenen Aluminiumbeutel) als auch die Reagenzien wieder bei 2–8°C zu lagern.
- Einmal benutzte Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Beschädigte Testkitkomponenten dürfen nicht verwendet werden.

- Ein direkter Kontakt von Proben mit den Testkitkomponenten ist zu vermeiden (Kreuzkontamination).
- Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung vermeiden.

7.2. HERSTELLUNG DES WASCHPUFFERS 1:10

1 Teil des Waschpufferkonzentrates wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Sollten im Waschpufferkonzentrat Kristalle zu sehen sein, lösen Sie diese durch Erwärmen des Waschpufferkonzentrates im Wasserbad bei 37 °C auf. Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20–25 °C) 5 Tage haltbar.

7.3. PROBENVORBEREITUNG / PROBENVERDÜNNUNG 1:600

- Plasma und Serum muss zur Testung 1:600 mit PVP verdünnt werden, bitte mindestens 5 µl Probe einsetzen, am besten mit einer Vorverdünnung arbeiten.

Beispiel:

Vorverdünnung (1:10) 5 µl Probe + 45 µl PVP

Endverdünnung (1:600): 5 µl Vorverdünnung + 295 µl PVP (= finale Proben-Puffer-Mischung PPM)

- Homogenisieren Sie die PPM gut (mehrmaliges Mischen mit der Pipette oder auf einem Vortex-Mixer).
- **ACHTUNG:** Bei Verwendung eines ELISA-Waschautomaten muss die PPM partikel-frei sein! Um dies zu gewährleisten, zentrifugieren Sie bitte die PPM bei 5000 Upm für 5 Minuten.
- Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Probenmaterial vor der Verwendung gut homogenisieren!
- Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Position der Patientenproben und der Standards/Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. **Es wird empfohlen, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung zu testen.**
- Für jeden Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

8.1. PROBENAUFTRAG UND ERSTE INKUBATION

- Stecken Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in den Halterahmen.
- Geben Sie jeweils **50 µl**
 - **Positivkontrolle**
 - **Negativkontrolle**
 - **verdünnte Proben (PPM)**

in der gewünschten Reihenfolge in die jeweilige Vertiefung des Mikrotiterstreifens. **Lassen Sie eine Vertiefung übrig für die Substrat-Leerwertbestimmung.**

- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25 °C)**.

8.2. WASCHEN – SORGFÄLTIG UND STRIKT NACH ANLEITUNG!

WASCHEN PER HAND

- Entsorgen Sie das Inkubat durch Ausleeren in einen Abfallbehälter mit Hypochlorit. Gemäß den behördlichen Vorschriften entsorgen!
- Klopfen Sie die Mikrotiterplatte mehrmals auf einem saugfähigen Papier/Labortuch aus.
- Waschen Sie 5× mit jeweils 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung. Platte mit Waschlösung leicht schwenken, dann ausklopfen.
- **Zwischen jedem Waschgang komplett entleeren und dann sorgfältig mehrmals auf einer trockenen, unbenutzten Stelle ausklopfen!**
- Vor dem letzten Ausklopfen darauf achten, dass das Reagenz für den nächsten Pipettierschritt bereit steht.

WASCHEN PER WASCHAUTOMAT

- **ACHTUNG:** PPM mit Partikeln sollten vor dem ersten Waschschrift manuell durch Ausklopfen aus den Vertiefungen entfernt werden (Verstopfungsgefahr der Waschnadeln).
- Korrekte Einstellung des Automaten beachten!
- Zur Erzielung optimaler Waschergebnisse mindestens 300 µl Waschpuffer pro Kavität und Waschschrift.
- Komplettes Absaugen der Flüssigkeit nach jedem Waschschrift.
- Nach letztem Waschschrift Platte gründlich auf saugfähigem Papier/Labortuch ausschlagen! Es sollte keine Restfeuchtigkeit in den Kavitäten zurückbleiben!

8.3. ZWEITE INKUBATION

- Geben Sie je **100 µl Konjugat** in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte außer der Substrat-Leerwertbestimmung.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für **45 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**.

8.4. WASCHEN

Waschen wie in Punkt 8.2.

8.5. DRITTE INKUBATION

- Geben Sie **100 µl Substrat (TMB)** in jede Vertiefung.
- Decken Sie die Mikrotiterplatte zu und inkubieren Sie für genau **15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** und **im Dunkeln**.
- Geben Sie **100 µl Stopp-Reagenz** in alle Vertiefungen, in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit wie für die TMB-Substratlösung.

8.6. MESSUNG

- Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Antippen an den Plattenrand) wird die Extinktion innerhalb 30 Minuten nach Zugabe des Stopp-Reagenz bei 450 nm gemessen. Eine zusätzliche Messung in der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.
- Der Abgleich des Nullwertes sollte gegen die Substrat-Leerwertbestimmung erfolgen. Sollte dies aus technischen Gründen nicht möglich sein, ziehen Sie bei der Auswertung die Extinktion dieser Vertiefung von allen anderen Extinktionswerten ab, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.
- **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.
- **ACHTUNG:** Stark positive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate der Substratlösung verursachen. Vorverdünnung der Probe mit physiologischer NaCl-Lösung, z.B. 1+1, wird empfohlen. Dann die Probe 1+100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnen und die Ergebnisse in MU mit 2 multiplizieren.

9. TESTAUSWERTUNG

9.1. REAGENZSTABILITÄT – INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testung sollten Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Stabilität der Reagenzien sowie die korrekte Testdurchführung sicherzustellen.

Der Test war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht wurden:

- **Substrat-Leerwertbestimmung** Extinktion < 0,1
- **Negativkontrolle** Extinktion < 0,1
- **Positivkontrolle** 0,8 < Extinktion < 2,2

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Vertiefungen ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein. Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

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

9.2. BERECHNUNG DER TESTERGEBNISSE

Der Cut-off-Wert liegt zwischen 0,200 und 0,500.

9.3. AUSWERTUNG DER TESTERGEBNISSE

Positives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert über dem Cut-off von 0,500 liegt.

Grenzwertiges Testergebnis

Probe, deren Extinktionswert im Bereich zwischen 0,200 und 0,500 (Cut-off) liegt. Ist eine Wiederholungsuntersuchung nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Probe ebenfalls grenzwertig, ist diese als negativ zu bewerten!

Negatives Testergebnis

Probe, deren Extinktionswerte unter dem Cut-off von 0,200 liegt.

10. LEISTUNGSMERKMALE

10.1. EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Bakterielle Kontamination kann die Extinktionswerte beeinflussen.
 - Die Diagnose einer Infektionserkrankung sollte nicht aufgrund eines einzelnen Tests gestellt werden. Eine konkrete Diagnose sollte sowohl Klinik, Symptomatik als auch serologische Daten berücksichtigen.
-

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Tragen von Schutzkleidung (Einmal-Handschuhe) und Händewaschen nach Ende der Testdurchführung.
- Essen und Trinken während der Testdurchführung verboten.
- Das Probenmaterial und die Kontrollen müssen als potentiell infektiös angesehen werden und sind mit den verwendeten Testkitkomponenten nach der Testdurchführung fachgemäß zu entsorgen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen zusammen verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen nach Gebrauch sofort fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- – Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, Kontrollen und Konjugat enthalten ProClin® 300 als Konservierungsmittel.
 - Stopp-Reagenz enthält 0.2 M Schwefelsäure. Schwefelsäure irritiert Augen und Haut. Bei Kontakt mit Augen intensiv mit Wasser spülen und den Arzt aufsuchen! Außer Reichweite von Kindern halten.
 - Substratlösung enthält Wasserstoffperoxid.

Eine Berührung mit Augen, Haut oder Schleimhaut ist unbedingt zu vermeiden!

- **ACHTUNG:** Flüssigabfall, der Stopp-Reagenz enthält, muss zuerst neutralisiert werden, bevor er in eine Hypochloritlösung gegeben wird!
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Niemals mit dem Mund pipettieren!
- Beschriften Sie Probenmaterial und zugehöriges Probenröhrchen, damit die exakte Zuordnung gewährleistet ist.
- Für jede Probe ein neues Probenröhrchen verwenden.
- Während der Inkubations- und Waschschrte müssen die Vertiefungen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.
- Die Wells der Mikrotiterplatte sollten nicht länger leer bleiben als unbedingt notwendig.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Testergebnissen Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Vertiefungen pipettieren.
- Der **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, das die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung 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 nicht für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse, die mit diesen Gründen in Zusammenhang stehen. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

12. HAFTUNG

Das gesamte Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produktes liegt beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für indirekte, spezielle oder daraus folgende Schäden jeglicher Art, die aus der Benutzung, Testdurchführung und -auswertung dieses Produktes resultieren.

13. KURZ-PROTOKOLL MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi

TESTVORBEREITUNG

Benötigte Mikrotiterstreifen und Reagenzien auf **Raumtemperatur (20–25°C)** bringen.

Waschpuffer 1:10 mit destilliertem Wasser **verdünnen**.

Proben 1:600 mit Verdünnungspuffer **verdünnen**.

TESTDURCHFÜHRUNG

Je **50 µl Positiv- und Negativkontrolle**
bzw. **1:600 verdünnte Plasma- oder Serumproben**
in je eine Vertiefung pipettieren.

Zugedeckt **60 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

5× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Konjugat**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **45 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)** inkubieren.

5× unter leichtem Schwenken mit **je 300 µl Waschpuffer waschen**.

Je **100 µl Substrat (TMB)**
in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.

Zugedeckt **genau 15 Minuten bei Raumtemperatur (20–25°C)**
im Dunkeln inkubieren.

Je **100 µl Stopp-Reagenz**
in jede Vertiefung pipettieren.

Photometrische Auswertung der Vertiefungen bei 450 nm.

1. INTRODUCTION

The infection with *Encephalitozoon cuniculi* occurs via spores in the urine of infected animals. The uptake of the extremely resistant spores mostly occurs perorally by contaminated food or inhalation in contaminated surroundings. That is why the spreading in house and laboratory animals is significantly quicker than in wild animals. Carnivores also could be infected by infected prey.

Neurological symptoms, signs of kidney failure, and eye skin inflammation may occur due to lesions in the central nervous system, kidney, and eye. Diseased rabbits can experience one or more of these symptoms. The most common is the so-called vestibular syndrome (head tilt, disorders of movement coordination and eye tremors). Other neurological symptoms can include seizures, incomplete paralysis, and loss of balance. In rare cases, increased aggression and loss of hearing or vision may also occur. In some animals, renal insufficiency with rather unspecific symptoms (loss of appetite or weight, dehydration, disorders of the mineral balance and bone metabolism as well as apathy) can be indicative.

The in vivo diagnosis of encephalitozoonosis in rabbits is problematic because of the large number of animals with chronic, asymptomatic infection. In this case, antibodies can be detected in the blood for years. The serological detection of antibodies against *E. cuniculi* is usually the most sensitive method to determine an infection; a negative antibody titre during this period normally excludes an infection with *E. cuniculi*.

MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi is based on highly specific antigens for the fast and reliable detection of IgG antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in plasma or serum of infected rabbits.

2. INTENDED USE

The **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgG antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in plasma or serum of the rabbit.

3. TEST PRINCIPLE

The **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi** is a qualitative immunoassay to detect IgG antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* using a sandwich principle.

Specific *Encephalitozoon cuniculi* antigens are bound to the surface of the well in the ELISA plate. A dilution of the rabbit plasma or serum to be tested as well as controls are incubated in a first step at room temperature (20–25°C) in the wells of the ELISA plate. After a wash step, anti-rabbit IgG conjugate labelled with horse radish peroxidase (HRP) is added and incubated at room temperature (20–25°C). Non-bound conjugate is removed in another wash step. After addition of Substrate (Tetramethylbenzidine [TMB]), with positive samples, the bound enzyme changes the colourless solution in the wells of the ELISA plate into a blue solution. By addition of Stop solution (Sulfuric acid), the colour changes from blue to yellow. The extinction is proportional to the concentration of *Encephalitozoon*-specific IgG antibodies present in the sample.

4. TEST-KIT COMPONENTS

4.1. COMPONENTS / REAGENTS PROVIDED WITH THE TEST-KIT

The reagents of one package are sufficient for 48 or 96 determinations.

Content	48's kit	96's kit
1. ELISA plate with separable test strips in holding frame with 8 determinations each, coated with <i>Encephalitozoon cuniculi</i> antigens	6 separable strips	12 separable strips
2. Sample dilution buffer (SDB, pH 7.2 ± 0.2, contains 0.045 % ProClin® 300), ready to use, blue cap	25 ml	50 ml
3. Wash buffer (10× TRIS buffer, pH 7.2 ± 0.2, contains 0.045 % ProClin® 300), white cap	25 ml	50 ml
4. Positive Control (contains 0.045 % ProClin® 300), ready to use, red cap	0.5 ml	1 ml
5. Negative Control (contains 0.045 % ProClin® 300), ready to use, blue cap	0.5 ml	1 ml
6. Conjugate (peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies, pH 7.2 ± 0.2, contains 0.045 % ProClin® 300), ready to use, white cap	6 ml	12 ml
7. Substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine [TMB]/ H ₂ O ₂), ready to use, yellow cap. Do not expose to sun light!	6 ml	12 ml
8. Stop solution (0.2 M Sulfuric acid), ready to use, red cap	8 ml	15 ml
9. Cover foil	1	1
10. Evaluation sheet	1	1
11. Instructions for use	1	1

4.2. REQUIRED, NON-PROVIDED REAGENTS / DEVICES

- Distilled or deionised water
- Disposable sample tubes
- Laboratory pipettes (5–100 µl, 1 ml)
- Vortex mixer
- Filter paper/laboratory cloths
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Stop watch
- Washing station for ELISA plates or multichannel pipette (300 µl)
- Photometer for ELISA plates (450 nm, reference filter 620 nm)
- Waste bin with a 0.5 % hypochlorite solution

5. STABILITY AND STORAGE



Store at
2–8°C



Expiry date
– see label



For veterinary use
only



Lot number



For research only



Do not use test-kit
components from
different kits, lot
numbers or beyond
stated expiry date.



Follow instructions for
use precisely

Microbial contamination must be avoided. After the expiration date, the guarantee of quality is not provided.

When opening the sealed aluminium pouch with the ELISA plate, care must be taken that the reclosable clip closure is not damaged or even separated! Remove the required amount of ELISA strips, leave the remaining strips in the bag, close the bag and store it at 2–8°C.

A direct influence of light onto the colourless Substrate must be absolutely avoided to prevent degradation/autooxidation/colour change to blue. If the Substrate colour has changed to blue, it cannot be used any more (functional incapacity).

6. INFORMATION ON THE SAMPLE MATERIAL

- Use only rabbit plasma or serum samples!
- Mix the sample material well before use!
- Original samples (undiluted plasma or serum) should be tested non-cooled (20–25°C) within 4 hours! At 2–8°C, the undiluted plasma or serum can be stored up to 5 days.
- Plasma or serum, diluted 1+600 in sample dilution buffer according to “7.3. Sample preparation” (p. 16), can be stored for testings in **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON** cuniculi: the sample-buffer mixtures (SBM) are stable for up to 28 days at room temperature, at 2–8°C they are stable up to 2 months, at –20°C they can be stored permanently and thawed and frozen up to 10 times.

ATTENTION: This information refers to the use of samples exclusively in the **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON** cuniculi and the stability of the *Encephalitozoon* IgG antibodies in the SBM, this does not apply to other parameters!

- Do not heat inactivate!
- Keep in mind that the sample material, as well as all used test-kit components, should have reached room temperature at the time of application.
- **ATTENTION:** Partially filled and/or insufficient mixed EDTA, Citrate or Heparin tubes could create interference effects resulting in varying test results.

7. TEST PREPARATION

! Read instructions for use carefully before starting the test. For the reliability of the results, it is important to follow the instructions for use exactly as described. Carry out the test in the given order and without delay. Use clean disposable tips for each pipetting step.

7.1. GENERAL

- Remove the test strips from the pouches after they have reached room temperature. To avoid loss by evaporation, it is advisable to cover or mask them.
- Mix the reagents well immediately before their use.
- After use, both non-used test strips (in closed aluminium pouch) and reagents should be stored at 2–8°C again.
- Test strips that were once used cannot be used again.
- Damaged test-kit components must not be used.
- Direct contact of samples with the test-kit components has to be avoided (cross-contamination).
- Direct solar radiation during testing must be avoided.

7.2. PREPARATION OF WASH BUFFER 1:10

Mix 1 part of the Wash buffer concentrate with 9 parts of distilled water. When crystals are visible in the Wash buffer concentrate, dissolve these by warming the Wash buffer concentrate up to 37°C in a water bath. The diluted buffer will be stable for 5 days if stored at room temperature (20–25°C).

7.3. SAMPLE PREPARATION / SAMPLE DILUTION 1:600

- Plasma and serum has to be diluted for testing 1:600 with SDB, please use at least 5 µl sample! We recommend to work with a pre-dilution.

Example:

Pre-dilution (1:10): 5 µl sample + 45 µl SDB.

Final dilution (1:600): 5 µl pre-dilution + 295 µl SDB (= final sample-buffer mixture SBM)

- Homogenise the SBM well (repeated mixture with pipette or vortex mixer).
- **ATTENTION:** During the use of an ELISA washing station, the SBM must be free of particles! To guarantee this, please centrifuge the SBM with 5000 rpm for 5 minutes.
- Controls are ready for use and need not to be diluted.

8. TEST PROCEDURE

- Mix sample material well before application!
- Before beginning, the position of the patient samples and the standards/controls in the microtitre plate must be determined on the result sheet supplied with the kit. **It is recommended to test Controls and samples in duplicates.**
- Use clean disposable pipette tips for every pipetting step.

8.1. SAMPLING AND FIRST INCUBATION

- Place the required amount of test strips into the holding frame.
- Add **50 µl** each of
 - **Positive Control**
 - **Negative Control**
 - **diluted samples (SBM)**in the desired order into the particular cavity of the test strip. **Leave one well empty for the Substrate Blank.**
- Cover the ELISA plate and incubate for **60 minutes at room temperature (20–25 °C)**.

8.2. WASHING – CAREFULLY AND STRICTLY FOLLOWING THE INSTRUCTIONS!

MANUAL WASHING

- Remove the incubation solution by emptying into a waste bin with hypochlorite. Disposal must be made according to official regulations!
- Beat the ELISA plate carefully several times onto filter paper/laboratory cloth.
- Wash 5× with 300 µl Wash buffer per cavity. Shake plate with Wash buffer lightly, then beat it.
- **Drain completely between each wash step, then beat carefully several times on a dry unused spot!**
- Before the last beating take care that the reagent for the next pipetting step is prepared.

AUTOMATIC WASHING

- **ATTENTION:** SBM still containing any particles should be manually removed from the cavities by shaking off (danger of blockage of the washing needles).
- Observe correct setting of the washing station!
- To reach optimal washing results use at least 300 µl Wash buffer per cavity and wash step.
- Aspire liquid completely after each wash step.
- After the final wash step, beat the plate carefully but thoroughly on filter paper/laboratory cloth! There should not be any residual moisture in the cavities!

8.3. SECOND INCUBATION

- Add **100 µl Conjugate** into each cavity of the test strip except for the Substrate Blank well.
- Cover the ELISA plate and incubate for **45 minutes at room temperature (20–25 °C)**.

8.4. WASHING

Wash as described in issue 8.2.

8.5. THIRD INCUBATION

- Add **100 µl Substrate (TMB)** into each cavity.
- Cover the ELISA plate and incubate for exactly **15 minutes at room temperature (20–25 °C) and in the dark.**
- Add **100 µl Stop solution** into each cavity, in the same order and at the same rate as for the TMB substrate solution.

8.6. MEASUREMENT

- After careful mixing (tipping softly at the plate rim), the extinction can be measured at 450 nm within 30 minutes after addition of the Stop solution. An additional measurement at the reference wavelength 620 nm is recommended.
- Adjust the ELISA Plate Reader to zero using the Substrate Blank. If – due to technical reasons – the ELISA Plate Reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank well, subtract the extinction value of this well from all other extinction values measured in order to obtain reliable results!
- If duplicates or multiple determinations were done, calculate the **mean absorbance values.**
- **ATTENTION:** Strongly positive samples can cause blackish precipitates of the Substrate solution. Pre-dilution of the sample with physiological NaCl solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with Sample dilution buffer and multiply the results in MU by 2.

9. TEST EVALUATION

9.1. REAGENT STABILITY – INTERNAL QUALITY CONTROL

During each testing, Positive and Negative Controls should be performed to ensure the stability of reagents as well as the correct test procedure.

The test was correct, when following reference values were reached:

- **Substrate Blank** Extinction < 0.1
- **Negative Control** Extinction < 0.1
- **Positive Control** 0.8 < Extinction < 2.2

A variation of the required values as well as any clouding or blue staining of the colourless Substrate before addition into the cavities can be a hint on expiry of reagents. If the prescribed values are not fulfilled, following should be ensured before test repetition:

- Stability of the used reagents
- Functionality of the used machines (calibration)
- Visual control of the test-kit components for contamination or leakage; a blueish stained Substrate solution should not be used.

9.2. CALCULATION OF TEST RESULTS

The Cut-off value is between 0.200 and 0.500.

9.3. EVALUATION OF TEST RESULTS

Positive test result

Sample with an extinction more than 10 % above the Cut-off.

Marginal test result

Sample with an extinction in the field of 10 % above and below the Cut-off. A repetitive test after 2–4 weeks with a new sample being marginal, too, should be evaluated as negative!

Negative test result

Sample with an extinction more than 10 % below the Cut-off.

10. FEATURES OF PERFORMANCE

10.1. LIMITATIONS OF THE TEST PROCEDURE

- Bacterial contamination may affect the extinction values.
 - 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.
-

11. SAFETY MEASURES AND PRECAUTIONS

- Wear safety clothes (disposable gloves) and wash the hands after finishing the test procedure.
- No eating and drinking during test procedure.
- The sample material and Controls must be seen as potentially infectious and disposed of accordingly, together with the used test-kit components, after the test procedure.
- Do not use reagents of other manufacturers together with the reagents of this test-kit.
- Do not mix reagents of different Lot numbers.
- Do not change the caps of the individual reagents among each other.
- Close bottles immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening, the reagent bottles must be checked for microbial contamination before reusing.

- – Sample dilution buffer, Wash buffer, Controls and Substrate contain ProClin® 300 as preservative.
- – Stop solution contains 0.2 M Sulfuric acid. Sulfuric acid irritates eyes and skin. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor! Keep out of the reach of children.
- – Substrate solution contains hydrogen peroxide.
Absolutely avoid eye, skin or mucosa contact!
- **ATTENTION:** Liquid waste containing Stop solution must be neutralised prior to addition to a hypochlorite solution!
- Only use clean pipette tips, dispenser and laboratory material.
- Never pipet with your mouth!
- Label sample material and associated sample tube to ensure a precise assignment.
- Use a new sample tube for each sample.
- During the incubation and wash steps, the cavities must be completely covered with liquid.
- The cavities of the ELISA plate must not stay empty longer as necessarily required.
- To avoid cross contamination and falsely elevated test results, pipet the patient samples and conjugate carefully into the cavities of the ELISA plate.
- **MegaELISA® ENCEPHALITOOZON** cuniculi is only provided for the use of qualified staff that knows the work technique objectionable.

The test procedure, the information, the safety measures and warnings in the Instructions for use are to be followed strictly. For use of the test-kit in diagnostic instruments, the test method has to be validated. Each change in appearance, composition and the application as well as each use in combination with other products not authorised by the manufacturer is not permitted. The manufacturer is not liable for false results and incidents being associated herewith. The user himself is responsible for such changes. No liability is accepted for false test results due to visual evaluation.

12. LIABILITY

The entire risk due to the performance of this product is assumed by the purchaser. The manufacturer shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from the use of this product.

13. SHORT PROTOCOL MegaELISA® ENCEPHALITOOZON cuniculi

TEST PREPARATION

Warm needed test strips and reagents to **room temperature (20–25°C)**.

Dilute Wash buffer 1:10 with distilled water.

Dilute samples 1:600 with Sample dilution buffer.

TEST PROCEDURE

Add **50 µl of Positive and Negative Controls**
or **1:600 diluted plasma or serum samples**
each in a cavity.

Cover and incubate **60 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 5× with soft shaking with **300 µl Wash buffer each**.

Add **100 µl of Conjugate**
into each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **45 minutes at room temperature (20–25°C)**.

Wash 5× with soft shaking with **300 µl 1× Wash buffer each**.

Add **100 µl of Substrate (TMB)**
in each cavity. Mix carefully.

Cover and incubate **exactly 15 minutes at room temperature (20–25°C)**
in the dark.

Add **100 µl of Stop solution**
in each cavity.

Photometric evaluation of the cavities at 450 nm.

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES

FÜR EIGENE NOTIZEN / FOR YOUR OWN NOTES**Abkürzungen / Abbreviations**

- H_2O_2 Wasserstoffperoxid/Hydrogen peroxide
- PPM Proben-Puffer-Mischung (DE)
- PVP Probenverdünnungspuffer (DE)
- SBM Sample buffer mixture (EN)
- SDB Sample dilution buffer (EN)