

# ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de l'amibiase invasive à *E. histolytica*

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage in vitro

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9550  
N° CE: CH-201202-0033



## Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique (IgG) de l'amibiase invasive chez des patients ayant séjourné en zones d'endémie et qui développent des symptômes tels que douleurs abdominales, fièvre et hépatomégalie, parfois plusieurs années après le voyage.  
Contrôle post thérapeutique.

## Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de trophozoïtes de *Entamoeba histolytica*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

## Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

<b>WELL</b>	9550-01	Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles d' <i>Entamoeba histolytica</i>	96	puits
<b>DILB</b>	9550-02	Tampon de dilution (concentré 10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9550-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9550-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
<b>STOP</b>	9550-05	Solution d'arrêt (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9550-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9550-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9550-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
<b>CONJ</b>	9550-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline	300	µl
<b>SUBS</b>	9550-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

## Conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8° C (transport à température ambiante). La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

## Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes ( $\mu\text{l}$  et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37° C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm.

## Préparation des réactifs avant l'usage:

**Barrettes sensibilisées:** ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9550-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

**Tampon de dilution:** diluer le tampon de dilution concentré 10 x 9550-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

**Solution de lavage:** diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9550-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

**Sérums de contrôles** négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10  $\mu\text{l}$  de chaque sérum de contrôle 9550-06 à 08 dans 190  $\mu\text{l}$  de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/20).

**Sérums à tester:** diluer 10  $\mu\text{l}$  de sérum dans 2.0 ml de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/201).

**Conjugué protéine A – phosphatase alcaline:** diluer le conjugué 9550-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

**Solution de substrat:** équilibrer le tampon de l'enzyme 9550-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9550-10 dans le tampon de l'enzyme 9550-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

**Solution d'arrêt:** utiliser le réactif 9550-05 non dilué.



**Précautions d'utilisation:** Les solutions 9550-02, 9550-03, 9550-04 et 9550-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium ( $\text{N}_3\text{Na}$ ). La solution 9550-02 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9550-05 (0.5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9550-06 à -08) proviennent de lapins.

## Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Tampon de dilution (10 x)</b>	9550-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Sol. de lavage (10 x)</b>	9550-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Conjugué</b>	9550-09 + tampon de dilution	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Sérums de contrôles</b>	9550-06 à -08 + tampon de dilution	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Sérums à tester</b>	Serum + tampon de dilution	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Solution de substrat</b>	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## **Méthode:**

### **Etape 1: Blocage:**

Remplir complètement les puits avec la solution de tampon de dilution.

Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes en dessus d'un évier.

### **Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:**

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc en absence de sérum).

Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).

Remplir les autres puits avec les sérums à tester dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec la solution de lavage.

### **Etape 3: Incubation avec le conjugué:**

Distribuer 100 µl du conjugué protéine A - phosphatase dilué dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la solution de lavage.

### **Etape 4: Incubation avec le substrat:**

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

### **Etape 5: Mesure de la densité optique:**

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

## Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc en absence de sérum de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis : DO contrôle positif > 1.200, DO contrôle négatif < 14% du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9550-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'amibiase et les sérums de sujets sains.

Le résultat est **négatif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus basse que celle du sérum seuil 9550-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Entamoeba histolytica* n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus élevée que celle du sérum seuil 9550-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Entamoeba histolytica* est considérée comme cliniquement significative.

## Sensibilité et spécificité du test:

Une **sensibilité** de **100%** a été observée avec 52 sérums provenant de patients présentant une amibiase viscérale.

Une **spécificité** de **96%** a été observée avec 99 sérums de donneurs de sang (Suisses).

Une spécificité de 88,7% a été observée avec 71 sérums de patients pour lesquels le diagnostic d'amibiase a été évoqué, puis écarté avec certitude.

Une spécificité de 80% est observée avec 40 sérums de patients atteints d'autres parasitoses (helminthiases, protozooses). Les principales réactions croisées concernent la leishmaniose, le paludisme, la filariose et l'anguillulose.

Une étude interne a montré que les sérums lipémiques, ictériques ou hémolysés ne présentaient pas de problèmes pour la réalisation de ce test.

Dans tous les cas, il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des données cliniques, épidémiologiques, radiologiques et biologiques avant d'établir le diagnostic final.

La répétabilité a été évalué en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évalué en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
<b>Moyenne (densité optique)</b>	0.612	2.394	0.649	2.449
<b>Ecart-type (densité optique)</b>	0.040	0.162	0.041	0.162
<b>Coefficient de variation (%)</b>	6.5	6.8	6.3	6.6

## Références:

Nicholls, R.S., I Restrepo, M., Duque, S., Consuelo Lopez, M., Corredor, A. (1994) Standardization and evaluation of Elisa for the serodiagnostic of amoebic liver abscess. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **89**: 53-58.

Visser, L.G., Verweij, J.J., Van Esbroeck, M., Edeling, W.M., Clerinx, J. Polderman A.M. (2006) Diagnostic methods for differentiation of *E. histolytica* and *E. dispar* in carriers : performance and clinical implications in a non-endemic setting. Int. journal of med. microbiol. **296** : 397-403.



**BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA**

Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

