

# ENTAMOEBIA HISTOLYTICA

## Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la amebiasis invasiva

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9550

N° CE: CH-201202-0033



### Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de la amebiasis invasiva en pacientes que permanecieron en zonas endémicas y que desarrollan síntomas como dolor abdominal, fiebre y hepatomegalia, a veces años después del viaje.

### Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos sensibilizados con antígenos solubles de *Entamoeba histolytica*. La presencia de anticuerpos séricos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Los pocillos individuales sensibilizados, permiten de realizar pequeñas series de muestras.

### Material que contiene el kit (96 pruebas):

<b>WELL</b>	9550-01	Pocillos sensibilizados con antígenos solubles de <i>Entamoeba histolytica</i>	96	pocillos
<b>DILB</b>	9550-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9550-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9550-04	Tampón de la enzima	50	ml
<b>STOP</b>	9550-05	Solución de parada (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9550-06	Suero de control negativo	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9550-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9550-08	Suero de control positivo	200	µl
<b>CONJ</b>	9550-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	µl
<b>SUBS</b>	9550-10	Substrato de la fosfatasa	20	tabletas
		Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml	1	pieza
		Cuadro para el soporte de los pocillos	1	cuadro

### Conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8° C (el transporte a temperatura ambiente). La fecha de caducidad y el número de lote de producción son escritos en un costado de la caja.

## Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas ( $\mu\text{l}$  y ml). Recipientes. Tubos para la dilución des sueros. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de 405nm.

## Preparación de reactivos antes de la utilización:

**Pocillos sensibilizados:** Abrir el embalaje en aluminio 9550-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos. Poner los pocillos en el soporte. Si es necesario completar las posiciones no utilizadas con pocillos ya utilizados. Disponer el soporte en el cuadro respetando la orientación. Mantenga los pocillos no utilizados sellados en la bolsa con el desecante.

**Tampón de dilución:** diluir el tampón de dilución concentrado 10 x 9550-02, 1/10 en agua destilada.

**Solución de lavado:** diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9550-03, 1/10 en agua destilada. Si usted desea utilizar su propia solución de lavado, evite tampones que contienen fosfato, lo cual podría inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.

**Sueros de control** negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo: diluir 10  $\mu\text{l}$  de cada suero de control 9550-06 a -08 en 190  $\mu\text{l}$  de tampón de dilución (dilución final: 1/20).

**Sueros de pacientes:** diluir 10  $\mu\text{l}$  de suero en 2.0 ml de tampón de dilución (dilución final: 1/201).

**Conjugado proteína A-fosfatasa alcalina:** diluir el conjugado 9550-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

**Solución de sustrato:** equilibrar el tampón de la enzima 9550-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9550-10 en el tampón de la enzima 9550-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto.

**Solución de parada:** utilizar el reactivo 9550-05 no diluido.



**Precauciones de uso:** Las soluciones 9550-02, 9550-03, 9550-04 y 9550-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio ( $\text{Na}_3\text{N}_3$ ). La solución 9550-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9550-05 (0.5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9550-06 a -08) son sueros de conejo.

## Volúmenes a preparar:

			Cantidad de pocillos a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampón de dilución (10 x)	9550-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	9550-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9550-09 + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	9550-06 à -08 + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sueros a analizar	suero + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Sol. de sustrato	9550-10 + 9550-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## **Procedimiento:**

### **Etapas 1: Bloqueo:**

Llenar completamente los pocillos con la solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos a temperatura ambiente (bloqueo de los pocillos).

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

### **Etapas 2: Incubación con las muestras de suero a analizar:**

Llenar el primer pocillo de la tira con 100 µl de tampón de dilución (Blanco sin suero)

Llenar los 3 pocillos siguientes con 100 µl de sueros de controles diluidos (suero negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo).

Llenar los otros pocillos con los sueros a analizar diluidos (100 µl).

Cubrir los pocillos con un film adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con la solución de lavado.

### **Etapas 3: Incubación con el conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado proteína A-fosfatasa diluido en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con la solución de lavado.

### **Etapas 4: Incubación con el sustrato:**

Distribuir 100 µl de la solución del sustrato en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Parar la reacción en adicionando 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.

### **Etapas 5: Medida de la densidad óptica:**

Limpia la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente, eliminar las burbujas de aire en caso de necesidad y proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm.

## Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen: DO del control positivo >1.200, DO del control negativo <14% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo (cut off) 9550-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de amebiasis invasiva y los sueros de sujetos sanos.

El resultado es **negativo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es menor que la del suero cut off 9550-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de *Entamoeba histolytica* no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es mayor que la del suero cut off 9550-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de *Entamoeba histolytica* es considerado como clínicamente significativo.

## Sensibilidad y especificidad de la prueba:

Se observó una sensibilidad de 100% con 52 sueros provenientes de pacientes que presentaban una amebiasis visceral.

Se observó una especificidad de 96% con 99 sueros provenientes de donadores suizos de sangre.

Se observó una especificidad de 88,7% con 71 sueros de pacientes por los cuales el diagnóstico de amebiasis fue evocado y posteriormente descartado con certeza.

Se observó una especificidad del 80% con 40 sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias (por helmintos y protozoarios). Las principales reacciones cruzadas se relacionan con la leishmaniasis, la malaria, la filariasis y la estrongiloidiasis. Un estudio interno ha demostrado que los sueros lipémicos, ictericos o hemolizados no representan un problema para la realización de esta prueba.

En todos los casos, es necesario juntar todos los antecedentes clínicos, epidemiológicos, radiológicos y biológicos antes de establecer un diagnóstico final.

La repetitividad ha sido evaluada analizando 2 sueros humanos en 24 pocillos de una placa en una prueba única. La reproducibilidad ha sido evaluada analizando estas 2 muestras precitadas en 10 pruebas diferentes.

	Repetitividad		Reproducibilidad	
	Muestras 1	Muestras 2	Muestras 1	Muestras 2
<b>Media (densidad óptica)</b>	0.612	2.394	0.649	2.449
<b>Desviación estándar (absorbance)</b>	0.040	0.162	0.041	0.162
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	6.5	6.8	6.3	6.6

## Bibliografía:

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**

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

