

Entamoeba histolytica IgG ELISA

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de amebíase invasiva humana

96 ensaios em poços individuais para utilização em diagnóstico in vitro e para laboratorial profissional



Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9550
N.º reg. CH-201202-0033 - UDI-DI: 07640158219553



Utilização prevista:

O kit *Entamoeba histolytica* IgG ELISA da Bordier destina-se a detetar quantitativamente anticorpos IgG contra *Entamoeba histolytica* em soro humano. A sorologia auxilia no diagnóstico e não pode ser utilizada como o único método de diagnóstico.

Contexto:

A amebíase é provocada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, uma ameba patogénica. Os seres humanos podem ser infetados ao ingerirem acidentalmente quistos améebicos em alimentos ou água contaminados. Os sintomas mais frequentes surgem durante a fase intestinal (dor de estômago e diarreia). Contudo, em alguns casos, o parasita torna-se invasivo a nível extra-intestinal, resultando em formação de abcesso principalmente no fígado. Os doentes têm principalmente febre e dor abdominal. O diagnóstico de amebíase extra-intestinal é feito com base em técnicas de imagiologia como TC, ultrassons e RM para detetar lesão hepática e num resultado positivo em testes sorológicos. Também é utilizada sorologia para excluir amebíase no contexto do diagnóstico diferencial com outras doenças hepáticas.

Princípio e apresentação:

O kit fornece todo o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA em poços de microplaca quebráveis sensibilizados com antígenos de tofozoítos solúveis de *Entamoeba histolytica*. Anticorpos específicos na amostra ligar-se-ão a estes antígenos e a lavagem irá remover anticorpos não específicos. A presença de anticorpos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. Uma segunda lavagem irá remover conjugado não ligado. A revelação de anticorpos ligados é efetuada adicionando substrato pNPP, que adquire uma cor amarela na presença de fosfatase alcalina. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de anticorpos específicos de *Entamoeba histolytica* na amostra. É adicionado fosfato de potássio para parar a reação. A absorvância a 405 nm é lida utilizando um leitor de microplacas ELISA. O teste pode ser realizado com sistemas automáticos, mas esta situação requer validação por parte do utilizador.

Material incluído no kit (96 ensaios):

WELL	9550-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com antígenos de tofozoítos solúveis de <i>Entamoeba histolytica</i>	96	poços
DILB	9550-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x), cor roxa	50	ml
WASH	9550-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
ENZB	9550-04	Tampão da enzima	50	ml
STOP	9550-05	Solução de paragem (0,5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9550-06	Soro de controlo negativo (20 x), tampa verde	200	µl
CONTROL -/+	9550-07	Soro de controlo fracamente positivo (cut off, 20 x), tampa amarela	200	µl
CONTROL +	9550-08	Soro de controlo positivo (20 x), tampa vermelha	200	µl
CONJ	9550-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina (50 x), tampa roxa	300	µl
SUBS	9550-10	Substrato de fosfatase (para-nitrofenilfosfato)	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2-8°C (transportar à temperatura ambiente), evitar exposição dos componentes a longo prazo à luz direta. A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa. Após a abertura inicial, todos os reagentes se mantêm estáveis até ao final do prazo de validade, desde que armazenados entre 2-8°C.

Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos de diluição. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37°C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm. Equipamento manual ou automático para lavagem de poços. Agitador tipo vórtex. Temporizador.

Preparação de reagentes antes da sua utilização:

Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente e misturar antes de utilizar.

Poços ELISA: abrir a parte lateral do saco de alumínio 9550-01 e retirar a quantidade de poços necessários (um para solução branco, três para controlos além do número de amostras). Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

Tampão de diluição: diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9550-02, 1/10 em água destilada. É utilizado para a diluição de controlos, amostras e conjugado. O tampão diluído mantém-se estável durante dois meses entre 2-8°C.

Solução de lavagem: diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9550-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina. A solução de lavagem diluída mantém-se estável durante dois meses entre 2-8°C.

Soros de controlo: diluir 10 µl de soros de controlo 9550-06 a -08 em 190 µl de solução tampão de diluição (dil. final 1/20). Os soros de controlo diluídos mantêm-se estável durante dois meses 2-8°C.

Conjugado: diluir conjugado 9550-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/50). Diluir o conjugado no dia do ensaio. Não armazenar conjugado diluído.

Solução de substrato: dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9550-10 em tampão enzimático não diluído 9550-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s). Diluir substrato no dia do ensaio e proteger o tubo de luz direta. As pastilhas e as soluções de substrato devem ser incolores ou apresentar apenas uma leve tonalidade amarela. Se uma pastilha ou uma solução de substrato ficar amarela, pode ter sido parcialmente hidrolisada e deve ser eliminada. Não armazenar a solução de substrato.

Solução de paragem: utilizar reagente 9550-05 não diluído.

Recolha e preparação de amostras:

Utilizar soro humano. O soro deve ser armazenado entre 2-8°C se for analisado nos dias seguintes. Caso contrário, armazenar a uma temperatura igual ou inferior a -20°C. Evitar congelar e descongelar repetidamente. Agitar as amostras em vórtex e diluir 1/201 em solução tampão de diluição (por exemplo, uma amostra de 5 µl em 1,0 ml).

Advertências e precauções:

Os compostos tóxicos apresentam a seguinte concentração:

Componente	Referência	Azida de sódio (N ₂ N ₃)	Mertiolato
Tampão de diluição (10 x)	9550-02	0,1%	0,02%
Solução de lavagem (10 x)	9550-03	0,05%	/
Tampão enzimático	9550-04	0,01%	/
Soros de controlo (20 x)	9550-06 a -08	0,1%	0,02%
Conjugado (50 x)	9550-09	0,1%	/

Nas concentrações utilizadas, a azida de sódio e o mertiolato não representam qualquer risco toxicológico em contacto com a pele e as membranas mucosas.

- A solução de paragem 9550-05 (0,5 M K₃PO₄) é irritante.
- Soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9550-06 a -08) são de coelhos.
- Tratar todos os reagentes e amostras como material potencialmente infeccioso.
- Não trocar reagentes de lotes diferentes ou kits ELISA da Bordier.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes com reagentes deste kit.
- Não utilizar reagentes após o prazo de validade.
- Fechar bem os frascos de reagentes imediatamente após a utilização e não trocar as tampas para evitar contaminação.
- Utilizar pontas de pipetas separadas e limpas para cada amostra.
- Não reutilizar micropoços.
- Evitar a deterioração dos micropoços por ação mecânica (tips/cones, bicos).
- As descrições dos símbolos utilizados nas etiquetas podem ser encontradas no site www.bordier.ch.

Considerações sobre eliminação:

Por norma todos os materiais utilizados para este teste são considerados resíduos perigosos. Consultar as leis e regulamentos nacionais e regionais relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

Procedimento:

Ao realizar o ensaio, evitar a formação de bolhas nos poços.

Passo 1: bloqueio:

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

Passo 2: incubação com amostras:

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com, respetivamente, 100 µl de soro de controlo negativo, fracamente positivo (cut off) e positivo. No caso de ensaios com mais de 25 amostras, recomendamos encher os últimos três poços com soros de controlo como duplicado.

Encher os restantes poços com as amostras diluídas (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.

Remover os soros e lavar 4 x com cerca de 250 µl de solução de lavagem.

Passo 3: incubação com conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado diluído em cada poço (incluindo solução branco sem soro).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com cerca de 250 µl de solução de lavagem.

Passo 4: incubação com substrato:

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37°C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

Passo 5: medição das absorvâncias:

Se necessário, limpar o fundo dos poços e eliminar bolhas. Medir absorvâncias a 405 nm numa hora após a adição da solução de paragem.

Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. Quando aplicável, calcular os valores médios de absorvância de controlos de soro duplicados. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios:

- Absorvância (A) do controlo positivo > 1,200
- A do controlo positivo fraco > 12% de A de controlo positivo
- A do controlo negativo < 12% de A do controlo positivo
- A de em branco sem soro < 0,350

Os controlos de qualidade dos lotes atuais encontram-se publicados no nosso site: www.bordier.ch.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9550-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de amebíase invasiva e soros humanos saudáveis. O índice *cut off* de uma amostra é definido, após subtração da solução branco sem soro, da seguinte forma:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Amostra de absorvância}}{\text{Soro cut off de absorvância}}$$

O resultado é **negativo** quando o índice da amostra analisada é inferior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos de *Entamoeba histolytica* é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando o índice da amostra analisada é superior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos de *Entamoeba histolytica* é considerada clinicamente significativa. Indica que o doente esteve em contacto com o parasita.

Uma zona cinzenta pode ser definida por cada laboratório de acordo com a sua população de doentes. No caso de resultados-limite ou duvidosos, recomendamos repetir o teste duas a quatro semanas mais tarde com uma amostra fresca.

Em caso de resultado positivo ou duvidoso, recomendamos a realização de um teste de confirmação (na maioria das vezes por western blot) se o mesmo estiver disponível ou se for exigido pelos regulamentos nacionais.

Desempenho analítico:

Especificidade analítica:

Foi determinada uma especificidade de 80% em 40 soros de pacientes com outras infecções parasitárias. A reatividade cruzada ocorre principalmente em pacientes com leishmaniose, malária, filariose e estrongiloidose. Não foi observada qualquer interferência positiva ou negativa com concentrações suprafisiológicas de hemoglobina, lipídios ou bilirrubina em soros suplementados com interferentes.

Precisão:

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio. A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média (absorvância)	0,612	2,394	0,649	2,449
Desvio padrão (absorvância)	0,040	0,162	0,041	0,162
Coefficiente de variação (%)	6,5	6,8	6,3	6,6

Os seguintes desempenhos não podem ser avaliados porque não existe material de referência certificado para esta análise:

- Sensibilidade analítica (limites de detecção e quantificação)
- Precisão
- Veracidade
- Faixa de medição
- Linearidade

Atuações clínicas:

Sensibilidade de diagnóstico:

Foi determinada uma sensibilidade de 100% em 52 soros de pacientes que sofrem de amebíase invasiva.

invasive amebiasis:

Foi determinada uma especificidade de 96% m 99 soros de doadores de sangue (suíços). Determinou-se uma especificidade de 89% em 71 soros de pacientes com suspeita de amebíase, mas onde esta doença foi certamente descartada.

Valor preditivo positivo e negativo:

A um VPP de 81% e um VPN de 100% foram encontrados nas populações mencionadas acima.

Valores esperados em populações normais e afetadas:

Numa população normal de 71 soros de pacientes com suspeita de amebíase, mas onde esta doença foi certamente descartada, o valor do índice esperado é 0,57. Numa população afetada de 52 soros de pacientes que sofrem de amebíase invasiva, o valor do índice esperado é 5,43.

Incidentes:

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser notificado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro em que o utilizador e/ou o paciente se encontra.

Limitações:

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base em resultados de um único teste. Para ser preciso, um diagnóstico deve considerar a situação endêmica, o histórico clínico, a sintomatologia, imagiologia e dados serológicos.

Em doentes e recém-nascidos imunocomprometidos, os dados sorológicos têm valor limitado.

Referências:

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

