

RIDASCREEN[®] Entamoeba histolytica IgG

N.º do art.: K1721



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Tel.: +49 61 51 81 02-0 / Fax: +49 61 51 81 02-20



1. Finalidade

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG é um enzima-imuno-ensaio para a detecção de anticorpos IgG contra Entamoeba histolytica no soro humano.

O teste deve ser executado no caso de suspeita fundada de uma amebíase.

2. Resumo e explicação do teste

Entamoeba histolytica é um patógeno humano protozoário e constitui um dos parasitas mais comuns nos países em desenvolvimento, especialmente nas zonas tropicais e subtropicais.⁴ Anualmente, cerca de 50 milhões de pessoas são infectadas por este agente patógeno, das quais 100.000 morrem como resultado da infecção.¹ Normalmente, o agente patógeno é transmitido por via fecal-oral. Desta forma, os quistos infecciosos são absorvidos. Ao chegarem ao intestino delgado, transformam-se em trofozoítos vegetativos que, subsequentemente, colonizam o cólon.³ Através da invasão do parasita a partir do lúmen do intestino para a mucosa do cólon, 10% dos pacientes infectados desenvolvem amebíase invasiva.⁵ O período de incubação é altamente variável, por isso a incubação pode demorar alguns dias ou mesmo meses ou anos. Em caso de amebíase intestinal, o período de incubação, normalmente, demora entre 1 e 4 semanas.¹¹

Os sintomas clínicos de uma amebíase intestinal são dores abdominais e cólicas acompanhadas por náuseas e diarreia severa com fezes com sangue e muco. Durante a disenteria aguda, podem ocorrer complicações extra-intestinais tais como abscessos hepáticos provocados por contágio hematogênico que podem causar morte, se não forem tratados.³

Por causa da reação do sistema imunitário, ocorre, após uma infecção com Entamoeba histolytica, a formação de anticorpos específicos contra o agente patógeno. Estes podem ser comprovados no soro com a ajuda de processos imunológicos. Além da escolha apropriada do antígeno específico para o patógeno, o método de teste selecionado também tem um grande impacto nos resultados do teste.

3. Princípio do teste

Antígenos limpos são colocados em uma placa microtítulo. Nas amostras dos pacientes, os anticorpos presentes se ligam aos antígenos e são, numa segunda etapa, comprovados com uma proteína A marcada com enzima (conjugado). Através da enzima, um substrato sem cor (peróxido de uréia/TMB) é convertido em um produto final azul. A reação enzimática é finalizada com a adição de ácido sulfúrico. Com isso, ocorre simultaneamente a mudança da cor de azul para amarelo. A posterior medição é feita com um fotômetro a 450 nm (comprimento de ondas de referência \geq 620 nm).

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 doses.

Plate	96 doses	Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no quadro de suporte; revestidas com antígenos de <i>Entamoeba histolytica</i>
Diluent	100 ml	Tampão de amostra, solução NaCl tamponada de fosfato, pronta para o uso; de cor amarela
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, conc. de 10X; solução de NaCl tamponada 3X
Control + <i>Tampa vermelha</i>	1,2 ml	Controle positivo IgG, soro humano, pronto para o uso
Control - <i>Tampa transparente</i>	2,5 ml	Controle negativo IgG, soro humano, pronto para o uso
Conjugate <i>Tampa laranja</i>	12 ml	Conjugado de proteína A; pronto para o uso; proteína A conjugada em peroxidase em solução proteica estabilizada
SeroSC	12 ml	Substrato, H ₂ O ₂ / tetrametilbenzidina; pronto para o uso
Stop	12 ml	Reagente bloqueador, 1 N ácido sulfúrico; pronto para o uso

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

5. Reagentes e a sua armazenagem

O kit deve ser armazenado de 2 - 8 °C e pode ser utilizado até a data de validade impressa no rótulo. Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou por 5 dias quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C). A garantia do kit não é válida após o vencimento do kit.

O saco de alumínio, no qual a microplaca se encontra, deve ser aberto de um modo que o fecho zipper não seja arrancado.

As tiras não necessárias devem ser armazenadas no saco de alumínio fechado.

Uma contaminação do reagente deve ser evitada bem como a luz direta sobre o substrato incolor.

6. Reagentes e equipamentos adicionais necessários

6.1. Reagentes

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de amostra
- Mixer Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Cilindro de medição (1000 ml)
- Cronômetro
- Aparelho de lavagem para as microplacas ou pipetas de vários canais
- Fotômetro para placas microtítulo (450 nm, filtro de referência ≥ 620 nm)
- Filtro de papel (lenços de laboratório)
- Contentor para lixo com uma solução de hipocloreto de 0,5 %

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco, óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usadas amostras ou reagentes.

Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

Os soros de controle contidos no kit (controle positivo e controle negativo) foram testados para HIV e HCV-Ak, bem como HbsAg, e considerados negativos. Porém, eles devem, bem como as amostras de pacientes e todos os materiais que entrem em contato com eles, ser considerados como potencialmente infecciosos e manejados de acordo com as respectivas regras de segurança nacionais.

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Coleta e armazenagem das amostras

O teste é desenvolvido para a análise de amostras de soro humano. Após a coleta de sangue, o soro deve ser rapidamente tirado do coágulo para evitar uma hemólise do soro. As amostras devem ser armazenadas frias ou congeladas até serem usadas para o teste. Deve-se absolutamente evitar um novo congelamento e descongelamento, bem como a contaminação microbiana. A utilização de amostras escurecidas, ictéricas, hemolíticas, lipêmicas inativadas do calor pode produzir falsos resultados.

Tab. 1: Armazenagem das amostras

Soro não diluído		Soro diluído
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Execução do teste

9.1. Generalidades

Antes da utilização, todos os reagentes e as tiras deve ser colocados em temperatura ambiente (20 – 25 °C). As tiras só devem ser retiradas do saco de alumínio após a temperatura ambiente tiver sido alcançada. Os reagentes devem ser misturados imediatamente antes da utilização. Após a utilização, o kit deve ser armazenado novamente a 2 – 8 °C.

Só deve ser retirada a quantidade de reagente necessária para a execução do teste. O reagente restante não deve ser colocado de volta nos vasos, pois isto pode levar a uma contaminação.

As tiras microtítulo não podem ser usadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras microtítulo não devem ser utilizadas se a embalagem estiver danificada ou se o vaso não é impermeável.

O tampão de amostra, o tampão de lavagem e o substrato não são específicos para o teste; eles podem também ser utilizados em outros ELISA RIDASCREEN® para a detecção de anticorpos contra parasitas

9.2. Fabricação do tampão de lavagem

1 parte do concentrado do tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para isso, coloca-se 100 ml do concentrado em um cilindro de mesa e enche-se com 1000 ml de água destilada. Cristais eventualmente disponíveis no concentrado devem ser dissolvidos anteriormente com calor (banho-maria a 37 °C).

Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou por 5 dias quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação das amostras

As amostras de soro a serem examinadas serão diluídas a 1:50 antes do início do teste com o tampão de amostra **Diluent**.

por ex. 10 µl de soro + 490 µl **Diluent**

Atenção!

Controle negativo e controle positivo são prontos para o uso e não devem ser diluídos.

9.4. Primeira incubação

Depois de enfiar um número suficiente de cavidades nos quadros de suporte, 100 µl dos soros diluídos e dos controles prontos para o uso **Control -** e **Control +** serão pipetados nas respectivas cavidades e incubados a temperatura ambiente (20 – 25 °C) por 15 minutos. Recomenda-se excutar o controle negativo **Control -** em dose dupla.

9.5. Lavagem

As cavidades devem ser esvaziadas em um contentor de dejetos com solução de hipocloreto para a desinfecção. Depois a placa é batida em papel absorvente para retirar restos de humidade. Então, lava-se 5 vezes, cada vez com 300 µl de tampão de lavagem. Com isso, deve fazer um esvaziamento completo após cada lavagem, batendo em uma parte inutilizada do papel.

Com a utilização de uma máquina automática de lavagem, deve-se observar o ajuste correto do equipamento com relação ao tipo de placa utilizado. Depois da lavagem, a placa é batida em papel absorvente para retirar restos de humidade.

9.6. Segunda incubação

Adição de 100 µl do conjugado de proteína A **Conjugate** em todas as cavidades. Depois a placa é incubada por 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavagem

Lavar 5 vezes de acordo com o ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adição de 100 µl do substrato **SeroSC** em todas as cavidades. Depois a placa é incubada por 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Depois, a reação é bloqueada com a adição de 50 µl de reagente bloqueador **Stop** em todas as cavidades. Após a cuidadosa mistura (batida suave na beira da placa) a absorbância é medida em um fotômetro de placa a 450 nm (comprimento das ondas de referência ≥ 620 nm). A compensação do valor zero é feita com o ar.

10. Controle de qualidade – Sinais da expiração do reagente

Para o controle de qualidade, o controle positivo e o controle negativo devem ser feitos a cada execução de teste (em dose dupla). O teste foi validado se o valor médio de absorvância do controle negativo a 450 nm for menor de 0,3. Se ambas as medições individuais apresentarem desvios de mais de 25 % do valor médio, o teste deve ser feito novamente. O valor de tira do controle positivo a 450 nm deve ser maior de 0,8.

Um desvio dos valores necessários, bem como um escurecimento ou coloração em azul do substrato incolor antes da adição nas cavidades, pode ser uma indicação de expiração do reagente.

Se os valores prescritos não são alcançados, antes da repetição do teste deve-se controlar o seguinte:

- Validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade dos equipamentos utilizados (por ex. calibragem)
- Execução correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit para verificar se há contaminação ou impermeabilidade; uma solução de substrato tingida de azul não pode mais ser usada

Se, após a repetição do teste, as condições não forem alcançadas novamente, entre em contato com o seu distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do índice das amostras

1. O valor médio de extinção do controle negativo é calculado.
2. Ao valor médio de tira é adicionado 0,150. Com resultado, obtém-se o cut-off do teste.
3. Através da divisão do valor de extinção da amostra pelo cut-off, obtém-se o índice das amostras.

p. ex.: Controle negativo 1	OD = 0,115
Controle negativo 2	O.D. = 0,125
Amostra	O.D. = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{Índice de amostras} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

11.2. Resultado do teste

Tab. 2: Avaliação do índice das amostras

	negativo	duvidoso	positivo
Índice das amostras	< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

12. Limites do método

O ensaio EIA RIDASCREEN® Entamoeba histolytica IgG ELISA indica anticorpos IgG contra Entamoeba histolytica. Ele deve ser executado no caso de suspeita de uma amebíase. Os resultados alcançados devem ser sempre interpretados em conjunto com o quadro clínico e outros resultados diagnósticos.

Os sinais dos anticorpos dependem da localização da infestação do parasita e podem variar de paciente para paciente.

No caso de um resultado de exame de fezes ameba positivo, uma detecção de anticorpos possibilita a identificação de Entamoeba histolytica sensu stricto como causa para os sintomas clínicos.

No caso de suspeita de uma dispersão extraintestinal do parasita, uma detecção positiva de anticorpos, mesmo com um exame de fezes negativo, pode indicar uma amebíase; os resultados devem ser confirmados pelos sintomas clínicos e por outros métodos diagnósticos.

Um resultado negativo não exclui uma amebíase. Nos tempos iniciais da infecção, os anticorpos podem ser tão poucos que o teste resulta como negativo ou marginal. Se houver de forma anamnésica a suspeita fundada de uma amebíase, uma outra amostra de soro deve ser examinada após alguns dias.

Um resultado positivo não exclui a presença de outros agentes patogênicos.

13. Características de desempenho

Tab. 3: Variação inter-ensaio (n=30)

<u>Variação inter-ensaio</u>	<u>IgG</u>	
	índice	VK
Serum 1	4,52	7,1 %
Serum 2	2,63	5,1 %
Serum 3	2,42	10,1 %
Serum 4	0,24	n/a

Tab. 4: Variação intra-ensaio (n=23)

<u>Variação intra-ensaio</u>	<u>IgG</u>	
	índice	VK
Serum 1	4,40	12,3 %
Serum 2	1,78	4,7 %
Serum 3	1,54	3,5 %
Serum 4	0,32	n/a

Tab. 5: Sensibilidade e especificidade em comparação com uma outro ELISA comerciais

	<u>IgG</u>
Sensibilidade	100,0%
Especificidade	100,0%

Tab. 6: Resultados com 200 soros de doadores examinados de um centro de doação de sangue na Alemanha

	negativo	duvidoso	positivo
200 soros de doadores	96,5%	2,0%	1,5%

Literatura

1. WHO/PAHO/UNESCO report: A consultation with experts on amoebiasis. Epidemiol Bull. 18,13–14 (1997).
2. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. Clin. Microbiol. 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
3. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A.: Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev. 13, 318-31 (2000)
4. Fotedar R., Stark D., Beebe N., Marriott D., Ellis J., Harkness J.: Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 20, 511-32 (2007)
5. Gathiram, V., and Jackson T. F.: A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. S. Afr. Med. J. 72, 669–672 (1987).
6. Katzwinkel-Wladarsch, S. et al.: Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimen. Am. J. Trop. Med.-Hyg. 51 (1), 115 - 118 (1994).
7. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. Der Mikrobiologe 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
8. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with *Entamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51 (2), 180 - 182 (1994).
9. Reed, Sh. L.: New Concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. Clin. Infect. Dis. 21 (Suppl. 2), 182 - 185 (1995).
10. Strachan, W. D. et al.: Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. Lancet 12, 561 - 563 (1988).
11. Tanyuksel M., Petri W.A. Jr.: Laboratory diagnosis of amebiasis. Clin Microbiol Rev. 16, 713-29 (2003)
12. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. Deutsches Ärzteblatt 93, Heft 51-52, 2659 - 2665 (1996).