



INSTRUÇÕES DE USO

Somente para Uso diagnóstico in vitro

E. HISTOLYTICA II

96 Testes

Revisão: Junho/08

Finalidade ou Uso

E. histolytica II é um teste imunoenzimático para detecção rápida da adesina da *E. histolytica* em amostras fecais humanas.

É indicado para utilização em amostras fecais de pacientes com diarreia ou disenterias para determinar a presença de infecção gastrointestinal por *E. histolytica*. Este teste pode ser utilizado em amostras fecais submetidas a testes clínicos de rotina em adultos ou crianças. Não é necessária a microscopia convencional para utilização deste teste.

Princípio

E. histolytica II utiliza anticorpos anti-adesina. As cavidades da microplaca presente no kit contêm anticorpos policlonais imobilizados que se ligam a adesina da *E. histolytica/dispar*. O conjugado é um anticorpo monoclonal conjugado a peroxidase específico para adesina de *E. histolytica*. No teste, uma alíquota da amostra fecal é emulsificada no Diluente e a amostra diluída é transferida para a cavidade da microplaca. Se adesina estiver presente na amostra, ele irá se ligar ao conjugado e ao anticorpo policlonal imobilizado durante a fase de incubação. Todo material não ligado é removido durante as etapas de lavagem. Seguindo-se a adição do substrato, uma cor é detectada devido ao complexo enzima-anticorpo-antígeno que se forma em presença da adesina.

Material fornecido

- **Diluente** – 40 ml (solução tampão com 0,02% de timerosal). O Diluente também é utilizado como controle negativo (Ver Procedimento do teste)
- **Conjugado** – 7,0 ml (anticorpo monoclonal de camundongo específico para adesina de *E. histolytica* marcado com peroxidase em solução contendo 0,02% de timerosal)
- **Substrato** – 14,0 ml (solução contendo substrato tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio)
- **Reagente Controle positivo** – 3,5 ml (adesina purificada de *E. histolytica* em solução contendo 0,02% de timerosal)
- **Tampão de Lavagem concentrado** – 50 ml, 20 x concentrado (tampão salina fosfato com 0,2% de timerosal)
- **Solução de Bloqueio** – 7,0 ml (ácido sulfúrico 1 M). Cuidado: evitar contato com a pele. Se houver contato, lavar imediatamente com água.
- **Microplaca** – 12 tiras, contendo 8 cavidades cada sensibilizadas com anticorpo policlonal específico para adesina de *E. histolytica*. Armazenada com dessecante.
- folhas adesivas plásticas
- 1 embalagem reselável

Material necessário, não fornecido

Pissete para Reagente de Lavagem

Pipetas plásticas

Recipiente de descarte e papel absorvente

Agitador tipo vortex

Tubos teste para diluição das amostras

Swabs descartáveis

1 frasco de 1 litro para Solução de Lavagem diluída

950 ml de água destilada para diluição do Reagente de Lavagem



Leitor de microplaca de ELISA para leitura a 450 nm ou 450/620 nm

Precauções

- Não misturar reagentes de lotes diferentes. Não utilizar o kit após a data de validade.
- Os reagentes devem estar a temperatura ambiente antes do uso.
- Tampas e rolhas possuem um código de cor, não misturar.
- Quando estiver manipulando as cavidades teste, cuidado para não arranhar a parte inferior da cavidade pois pode resultar em leituras de absorvâncias elevadas.
- Segurar o frasco conta-gotas verticalmente para assegurar uma gota ideal.
- Após o uso as cavidades da microplaca devem ser manipuladas e descartadas como material potencialmente infectante. Utilizar luvas durante a manipulação.
- Os reagentes contêm 0,02% de timerosal como conservante e devem ser manipulados com os cuidados normais de laboratório.
- A *Solução de Bloqueio* contêm ácido sulfúrico 0,6 N. Se ocorrer contato com a pele lavar com água imediatamente
- **As cavidades teste não utilizadas devem permanecer na embalagem resselável contendo o dessecante para protegê-las contra umidade.**
- O procedimento de lavagem deve ser realizado como explicado anteriormente, evitando reações com alto ruído de fundo.
- Utilizar amostras fecais dentro de 24 horas da coleta para obter resultado ótimos. Amostras congeladas (-20°C ou menos) podem perder atividade devido ao congelamento e descongelamento.
- *E. histolytica* II é somente para uso diagnóstico in vitro.

Armazenamento

A data de validade do kit vem especificada na rotulagem externa. As datas de expiração de cada componente estão indicadas em cada etiqueta individual (rotulagem interna). O kit deve ser armazenado entre 2-8°C e deve retornar a geladeira assim que possível após o uso.

Coleta e Manuseio das amostras

NOTA: Os procedimentos de coleta e manipulação utilizados pelo laboratório para amostras de fezes para cultura são apropriados. Não utilizar amostras que tenham sido armazenadas com formalina a 10%, SAF, ou PVA. As amostras devem ser transportadas logo que possível e armazenadas a 2-8°C . Se possível, testar as amostras dentro de 24 horas da coleta. Armazenar as amostras a -20°C ou menos, se o teste não puder ser realizado dentro de 48 horas. Congelamentos e descongelamentos da amostra, especialmente múltiplas vezes, pode resultar em perda de atividade devido a degradação da adesina. **Certificar-se que as amostras estejam homogeneizadas (vortex) antes da realização do teste. Isto inclui completa homogeneização da amostra antes da transferência para o Diluente e antes da transferência para a microplaca. O Diluente foi formulado para estabilizar a adesina na amostra fecal e minimizar a degradação.**

1. Preparar um tubo de diluição para cada amostra testada. Adicionar 400µL do Diluente a cada tubo. Etiquetar o tubo.
2. Homogeneizar em misturador (tipo vortex) a amostra fecal para garantir uma amostragem adequada.
3. Para **fezes sólidas**, utilizar um swab para transferir a amostra fecal para o tubo. Misturar o swab no Diluente para remover a maior quantidade possível de amostra e espremer o swab contra as paredes do tubo para retirar todo líquido residual. Este processo resulta na transferência de aproximadamente 0,15 a 0,20 gramas de amostra. Se não se utilizar um swab para transferência de amostras formadas, transferir aproximadamente 0,15 a 0,20 gramas de amostra (tamanho de uma pequena ervilha) para o Diluente. Para **fezes líquidas**, transferir 400µl da amostra para um tubo. Certificar-se que a amostra líquida esteja em suspensão (homogeneizadas) antes da transferência.

4. Homogeneizar os tubos em agitador tipo vortex por 10 segundos e armazenar a 2-8°C até a realização do teste. Homogeneizar novamente antes de transferir a amostra diluída para as cavidades da microplaca.

Procedimento

1. Duas cavidade controle devem ser utilizadas toda vez que um teste for realizado. Essas cavidades servirão como controle positivo e negativo. É necessária uma cavidade para cada amostra de paciente. Não são necessárias cavidades adicionais de controle para corridas com um grande número de amostras. Adicionar 1 gota (50 µl) de Conjugado (tampa vermelha) as cavidades do controle positivo, negativo e das amostras. Segurar o frasco do Conjugado na vertical quando adicionar as gotas. Marcas de identificação devem ser feitas diretamente sobre a cavidade.
2. Adicionar 1 gota (50 µl) do *Reagente Controle positivo (tampa preta)* à cavidade controle positivo e 100 µl do controle negativo (isto é, Diluente) à cavidade controle negativo. Adicionar 200 µl da amostra diluída as cavidades teste. Cortar a folha plástica adesiva do tamanho suficiente para cobrir as cavidades utilizadas. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas.
3. Descartar o conteúdo das cavidades em um recipiente próprio. Lavar as cavidades utilizando um pissete contendo a *Solução de Lavagem*, direcionado o jato para o fundo da cavidade, com força. Preencher as cavidades, e descartar a *Solução de Lavagem* em um recipiente próprio. Inverter a microplaca sobre uma toalha de papel seca; repetir a etapa de lavagem 4x utilizando uma folha de papel seca a cada vez. Se alguma partícula ficar na cavidade, continuar lavando até que seja completamente removida.

Nota: O *Tampão de Lavagem* concentrado é fornecido 20x concentrado (um precipitado pode ser observado). Ele deve ser diluído para 1 litro adicionado-se 50 ml do concentrado a 950 ml de água destilada. Etiquetar o frasco. Armazenar a *Solução de Lavagem* a 1X entre 2-8°C.

4. Após lavagem remover completamente qualquer resíduo líquido presente nas cavidades batendo a placa sobre o papel toalha até todo o líquido ser eliminado. Descartar o papel toalha e as amostras em recipiente próprio.
5. Adicionar 2 gotas (100µl) do *Substrato (tampa azul)* a cada cavidade. Gentilmente bater na lateral da placa para misturar. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Bater na lateral da placa no início e após 5 minutos para misturar o conteúdo das cavidades.
6. Adicionar uma gota de *Solução de Bloqueio* (tampa amarela) a cada cavidade. A adição da *Solução de Bloqueio* converte a cor azul à cor amarela que pode ser quantificada pela medição da absorvância a 450 nm em um leitor de microplacas ELISA (referência 620 ou 550 nm em leitor de comprimento de onda duplo). O instrumento deve ser zerado contra o ar. Limpar a parte inferior da cavidade antes da leitura da densidade óptica. Realizar a leitura dentro de 10 minutos após a adição da *Solução de Bloqueio*.

Controle de Qualidade

Um controle positivo e um negativo devem ser realizados a cada série de testes. A cavidade do Controle Positivo deve apresentar uma cor amarela e fornecer um valor de absorvância ≥ 0.500 , após subtração do valor da absorvância do controle negativo (Ver Interpretação dos resultados). A cavidade do controle negativo deve apresentar um valor de absorvância $< 0,150$. Os resultados não serão validados se as características de desempenho dos controles negativo e positivo não estiverem corretas. Se os resultados não forem os esperados entrar em contato com o Atendimento ao Consumidor.

Qualquer cavidade que apresente leitura positiva sem coloração visível (ver Interpretação dos Resultados) deve ser reposicionada, limpar a parte inferior da cavidade e ler novamente.

Cada componente do kit deve ser inspecionado para verificar qualquer sinal de vazamento. Após o recebimento, o kit deve ser inspecionado para se certificar que os componentes não estejam congelados ou aquecidos.

Os resultados, de acordo com os valores de absorvâncias dos controles, devem ser registrados e reportados de acordo com os procedimentos próprios de cada laboratório e devem ser armazenados de acordo com os procedimentos próprios para futuras referências.

Interpretação dos resultados

Interpretação Visual



O Controle Negativo não deve apresentar cor, ou no máximo uma cor amarela fraca. O Controle Positivo deve apresentar cor amarela. Se esses resultados não forem observados entrar em contato com o Atendimento ao Consumidor.

Uma amostra é considerada positiva se apresentar uma cor amarela quando comparada com o controle negativo.

Ela pode ser mais ou menos amarela que a observada na cavidade do controle positivo. Uma amostra é considerada negativa se a reação for incolor ou com coloração amarela mais fraca que a do controle negativo.

Interpretação Espectrofotométrica

1. Colocar a microplaca no leitor ELISA e ler a 450 nm
2. Determinar os valores de absorbâncias para o controle negativo. A leitura do controle negativo deve ser 0,150 ou menor. Se isso não ocorrer, o teste não pode ser validado e deve ser repetida, prestando atenção a etapa de lavagem.
3. Subtrair a leitura da cavidade do controle negativo das leituras das cavidades do controle positivo e das amostras antes da interpretação dos resultados (o leitor de microplacas ELISA deve ser zerado na cavidade controle negativo se essa etapa for realizada automaticamente)
4. A leitura do controle positivo deve ser maior que $\geq 0,500$ após a subtração da leitura do controle negativo. Se esse valor não for obtido, o teste deve ser repetido
5. Uma amostra é considerada positiva para adesina se a leitura for 0,0500 ou maior após a subtração da leitura do controle negativo. A amostra é considerada negativa para adesina se a leitura for $< 0,050$.
6. Um resultado positivo indica que adesina de *E. histolytica* está presente na amostra fecal. Um resultado negativo indica que adesina de *E. histolytica* não está presente na amostra fecal.

Valores esperados

Estima-se que *Entamoeba histolytica* infecte 500 milhões de pessoas ao redor do mundo (7,8). Cerca de 90% desses indivíduos permanecem assintomáticos, entretanto cerca de 10% desenvolvem sintomas clínicos que vão desde doença gastrointestinal até abscessos do fígado. Em média, 3500 casos de amebiasis por ano são reportados pelo CDC (Centers for Diseases Control) nos Estados Unidos (9). Grupos de alto risco incluem indivíduos que viajam para o exterior, imigrantes, imunodeprimidos, e homens homossexuais ativos (8). Cepas não patogênicas (*E. dispar*) são predominantes entre homens homossexuais (10). A doença é geralmente transmitida por indivíduos assintomáticos.

Limitações do procedimento

1. *E. histolytica II* detecta a presença de adesina em amostras de fezes. O teste confirma a presença do organismo. Os resultados devem ser interpretados por um técnico considerando-se a história clínica do paciente.
2. Amostras de fezes são complexas. Resultados ótimos são obtidos com amostras com menos de 24 horas. Se a amostra não puder ser testada nesse período ela deve ser congelada. Entretanto, congelamento e descongelamento múltiplos podem levar a perda de atividade devido à degradação da adesina.
3. Algumas amostras podem fornecer resultados inconclusivos. Isto pode ser devido a inúmeros fatores como a presença de substâncias marcadoras ou enzimas inativadoras na amostra de fezes. Nessas condições, a amostra deve ser retestada ou uma amostra fresca requerida para reteste.
4. Testes adicionais podem ser utilizados em conjunto com *E. histolytica II* incluindo observação visual dos organismos em amostras conservadas. Este teste, entretanto, não distingue *E. histolytica* de *E. dispar*. *E. histolytica II* ou a análise do zimodema, que requer cultura e análise eletroforética do isolado, são específicos para *E. histolytica*.
5. A magnitude do valor da absorbância não está correlacionada com a carga de organismos.
6. *E. histolytica II* somente foi validada em uma população com cultura positiva.

Características de desempenho

Sensibilidade / Especificidade

A) Em um estudo um total de 62 amostras que foram testadas pela cultura/zimodema e congeladas foram avaliadas utilizando-se *E. histolytica II*.

E. histolytica II detectou 31 amostras das 32 testadas. As demais 30 amostras foram negativas em ambos testes cultura/zimodema e *E. histolytica*.

Os resultados obtidos foram:

Sensibilidade Relativa	96.9 %
Especificidade relativa	100 %
Valor preditivo positivo	100 %
Valor preditivo negativo	96.8 %
Correlação	98.4 %

B) Em um estudo, realizado em Mirpur, Bangladesch, um total de 757 amostras foram testadas com *E. histolytica II* e os resultados comparados com os da cultura para *Entamoeba*. Um total de 31 amostras foram cultura-positivas. A análise do zimodema identificou 12 delas como positivas para *E. histolytica* e 19 para *E. dispar*.

E. histolytica II foi positivo para todas as 12 amostras *E. histolytica*-positivas e negativo para 18 das 19 amostras *E. dispar*-positivas. Encontrou-se 701 amostras de fezes negativas na cultura/zimodema e no *E. histolytica II*. 25 amostras foram cultura-negativa mas positiva com *E. histolytica II*. Os resultados comparativos forneceram:

Sensibilidade Relativa	100 %
Especificidade relativa	94.7 %
Valor preditivo positivo	92.3 %
Valor preditivo negativo	100 %
Correlação	96.8 %

C) Em um terceiro estudo, um total de 55 amostras foram testadas na TechLab. 47 amostras foram pontilhadas com trofozoítas de *E. histolytica* e 8 não. As amostras foram testadas com *E. histolytica* TEST, que é específica para *E. histolytica* e com *E. histolytica II*. As 47 amostras positivas foram positivas com ambos os testes e as 8 amostras negativas foram negativas em ambos os testes. *E. histolytica II* apresentou uma leitura de DO450 nm maior que *E. histolytica* TEST. As leituras espectrofotométricas de ambos os testes apresentaram 100% de correlação com a leitura visual.

Sensibilidade analítica

E. histolytica II detecta aproximadamente 0.2 a 0.4 ng de adesina de *E. histolytica* por cavidade.

Reprodutibilidade e Precisão

Reprodutibilidade intra-ensaio

O Coeficiente de Variação CV foi determinado pela análise de 3 amostras positivas e 3 negativas. Cada amostra foi analisada durante 5 dias.

Amostra	CV % médio
Positivas	13.8
Negativas	11.0



Reprodutibilidade inter-ensaio

Foram utilizadas 8 amostras, sendo 4 positivas (PZ, zimodema patogênica) e 4 negativas (NPZ, zimodema não patogênica) que foram testadas em um total de 12 vezes.

Amostra	CV % médio
Positivas	4.7
Negativas	7.28

Reatividade cruzada

E. histolytica II foi avaliado utilizando-se amostras positivas para uma variedade de parasitas fecais e bactérias. Não se observou nenhuma reatividade cruzada com amostras de fezes contendo os parasitas listados na Tabela abaixo.

<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Blastocystis hominis</i>
<i>Clostridium difficile</i>
<i>Espécies de Cryptosporidium</i>
<i>Endolimax nana</i>
<i>Entamoeba coli</i>
<i>Giardia lamblia</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Shigella sonnei</i>
<i>Trichuris trichura</i>

Referências Bibliográficas

1. Gathiram V and Jackson TFHG. 1987. South Afr. Med. J, 72: 669-672
2. Haque R, et al. J. Infect Dis. 1993., 167: 247-249
3. Iruken EM, et al. 1992. Clin. Infect. Dis., 14: 889-93
4. Petri WA Jr., et al. 1990. Infect. Immunol., 58: 1802-1806
5. Sargeant PG, et al. 1978. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72: 519-521.
6. Tannich E and Burchard GD. 1991. J. Clin. Microbiol., 29: 250-255

**Data de vencimento, No. de Lote, No. de Registro do
Ministério da Saúde e Responsável Técnico: VIDE EMBALAGEM**
Produzido por: TechLab Inc. - Corporate Research Park 1861 Pratt Drive, Blacksburg,
Virginia, USA

Importado e distribuído por: Medivax Indústria e Comércio Ltda
Av Venezuela 3, sala 303 Rio de Janeiro/RJ - CNPJ: 68.814.961-0001-73

Atendimento ao consumidor Tel: (0xx21) 2283-2833

Representante Legal
Ricardo Weizman

Responsável Técnico
Luciana Poli Fernandes
CRBio- 2 no 21.140/02