E. HISTOLYTICA II™

A 2nd generation Monoclonal ELISA for detecting
E. histolytica adhesin in fecal specimens
Catalog No. T5017 (96 Tests)
U.S. Patent #5,272,058
IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

ESPANOL p. 8
Una prueba de ELISA monoclonal de 2ª generación para la detección de la adhesina de *E. histolytica* en muestras fecales.
No. De catálogo T5017 (96 Pruebas)
IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 15
Ein monoklonales Testverfahren der zweiten Generation zum Nachweis des *E. histolytica* Adhäsins in Stuhlproben.
Katalognummer T5017 (96 Tests)
IVD *In-Vitro*-Diagnostikum

FRANCAISE p. 22
La deuxiène génération d'ELISA Monoclonal pour la détection de l'adhésine de *E. histolytica* dans les spécimens fécaux
Numéro de Catalogue T5017 (96 Analyses)
IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Made in the USA

Developed and Manufactured by:

TECHLAB®

2001 Kraft Drive
Blacksburg, VA 24060-6358 USA
www.techlab.com
TEL 1-800-832-4522 USA
TEL 1-540-953-1664 Outside USA

CE EC REP Emergo Europe
Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

E. HISTOLYTICA II™

INTENDED USE

The *E. HISTOLYTICA II*™ test is an enzyme immunoassay for the rapid detection of the adhesin of *E. histolytica* in human fecal specimens. It is indicated for use with fecal specimens from patients with diarrhea or dysentery to determine the presence of *E. histolytica* gastrointestinal infection. The test can be used for fecal specimens submitted for routine clinical testing from adults or children. Conventional microscopy is not a prerequisite for use of the test.

Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

SUMMARY AND EXPLANATION

Entamoeba histolytica (formerly referred to as pathogenic *E. histolytica*) and *E. dispar* (formerly referred to as nonpathogenic *E. histolytica*) are intestinal parasites that infect approximately a half billion people worldwide annually (1,2). Only malaria and schistosomiasis are believed to be more prevalent parasitic causes of morbidity and mortality. Of the huge number of persons infected, most are infected with *E. dispar,* which has not been associated with disease. Infection with *E. dispar* rather than *E. histolytica* is believed to explain, at least in part, the low rate of disease considering the high rate of infection. Even so, it is estimated that approximately 10% of the half billion people infected each year are infected with *E. histolytica*. These individuals become symptomatic and develop colitis and liver abscess, resulting in a mortality rate estimated between 40,000 and 120,000 persons annually. It is important to distinguish between these two species because *E. dispar* is not associated with colitis or liver abscess. In addition, inaccurate diagnosis may result in unwarranted and unnecessary treatment with harsh drugs with side effects.

Patients infected with pathogenic *E. histolytica* may show a wide range of conditions. Some are completely asymptomatic (1-7). These persons shed millions of cysts daily and represent a potential reservoir for dissemination. Some patients may show mild diarrhea that develops into bloody diarrhea with abdominal cramps, eventually resulting in fulminant colitis. Because of the tissue damage that can occur, perforation of the intestine may result and the amoeba may disseminate to other parts of the body. Approximately 10% of persons with invasive amebiasis develop liver abscess. The life cycle of *E. histolytica* is similar to that observed with other amoeba. The organism exists either as a trophozoite or as a cyst. Humans serve as the primary reservoir, with the organism being spread through ingested food and contaminated water, or by venereal transmission. The cyst is very stable. Once it enters the intestine, it begins to divide into trophozoites that bind to the intestinal mucosa via a galactose or N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin referred to as the galactose adhesin. Once the trophozoites have attached, they release tissue-damaging enzymes and proteins that lyse the mucosal cell. The galactose adhesins of *E. histolytica* and *E. dispar* cross-react serologically but contain distinct epitopes. The adhesin is antigenically conserved but monoclonal antibodies can be used to distinguish the adhesin from *E. histolytica* and *E. dispar*.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The *E. HISTOLYTICA II*™ test uses antibodies to the adhesin. The microassay wells contain immobilized polyclonal antibody that binds adhesin of *E. histolytica/dispar*. The *Conjugate* is a monoclonal antibody-peroxidase conjugate specific for *E. histolytica* adhesin. In the assay, an aliquot of a fecal specimen is emulsified in *Diluent* and the diluted specimen is transferred to a microassay well. If adhesin is present in the specimen, it binds to the conjugate and immobilized polyclonal antibody during the incubation phase. Any unbound material is removed during the washing steps. Following the addition of substrate, a color develops due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of adhesin.

MATERIALS PROVIDED

DIL | SPE — ***Diluent,*** 40 mL (buffered protein solution with 0.02% thimerosal)*. The *Diluent* also is to be used as the negative control solution (see TEST PROCEDURE).

CONJ | ENZ — ***Conjugate***, 7.0 mL (mouse monoclonal antibody specific for adhesin from *E. histolytica*; coupled to horseradish peroxidase and in a buffered protein solution with 0.02% thimerosal)*.

SUBS | REAG — ***Substrate,*** 14.0 mL (solution containing tetramethylbenzidine and peroxide).

CONTROL | + — ***Positive Control Reagent***, 3.5 mL (purified adhesin from *E. histolytica* in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal)*.

WASHBUF | 20X — ***20X Wash Buffer Concentrate***, 50 mL (20X concentrate containing phosphate-buffered saline, detergent, and 0.2% thimerosal)*.
Signal Word: Warning
H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure
H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects
P260, P273, P314, P391, P501

H_2SO_4 | 0.6N — ***Stop Solution***, 7.0 mL (0.6 N sulfuric acid). CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water immediately if contact occurs.
Signal Word: Danger
H314: Causes severe skin burns and eye damage
P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA | PLT — **12 *Assay Well Strips*,** each consisting of 8 wells coated with polyclonal antibody specific for adhesin from *E. histolytica* (stored with desiccant).

1 plastic resealable bag ***Plastic adhesive sheet***

*contains mercury

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Squirt bottle for Wash Solution
Refrigerator for storage (2°-8°C)
Plastic tubes for dilution of fecal specimens
1-L bottle for diluted Wash Solution
Vortex mixer
Plastic pipettes
Discard container/absorbent paper
Disposable swabs
950 mL distilled or deionized water for diluting Wash Buffer
ELISA reader that reads 450 nm or 450/620 nm

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. Rx Only - Prescription Only
2. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
3. Reagents from different kits should not be mixed. Do not use a kit past the assigned expiration date.
4. Reagents should be at room temperature before use.
5. Caps and tips are color coded; do not mix!
6. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
7. Hold dropper bottles vertically to ensure proper drop size.
8. ***Unused microassay wells must be replaced in the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture.***
9. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
10. Use fecal specimens within 24 hours of collection for optimal results. Frozen specimens (-20°C or lower) may lose activity due to freezing and thawing.
11. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear disposable gloves when doing the test.
12. The *20X Wash Buffer Concentrate* contains 0.2% Thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration this solution is classified as non-hazardous. The

Stop Solution contains 0.6N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.

13. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

STORAGE AND HANDLING

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on individual labels. The kit should be stored between 2° and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

NOTE: Standard collection and handling procedures used in-house for fecal specimens are appropriate. Do not use specimens that have been collected or stored in 10% formalin, Sodium Acetate Formalin, or Polyvinyl Alcohol fixatives. Specimens should be transported as soon as possible and stored between 2° and 8°C. If possible, test fecal specimens which are less than 24 hours old. Store specimens at -20°C, or lower, if the test cannot be performed within 48 hours. Freezing and thawing of the specimen, especially multiple times, may result in loss of activity due to degradation of the adhesin. **Make sure that specimens are thoroughly mixed (vortexed) prior to performing the assay. This includes complete mixing of the specimen prior to transfer to *Diluent* as well as complete mixing of the diluted specimen prior to transfer to the microwell.** The *Diluent* has been formulated to stabilize the adhesin in fecal specimens and minimize degradation.

1. Set up one dilution tube for each specimen to be tested. Add 400 µL *Diluent* to each tube. *Label the tube directly on the side*.
2. **Thoroughly mix (vortex) the fecal specimen to ensure adequate sampling.**
3. For **formed samples**, use a swab to transfer the fecal specimen to the tube. Coat the swab completely before transferring the specimen. Mix the swab in the *Diluent* to remove as much sample as possible and squeeze the swab against the side of the tube to express any residual liquid. This procedure results in the transfer of approximately 0.15 to 0.20 g of specimen. If the swab is not used for formed specimens, transfer approximately 0.15 to 0.20 g of specimen (about the size of a small pea) to *Diluent.* For **liquid samples**, transfer 400 µL specimen to tube. Make sure the liquid specimens are evenly suspended (vortexed) before transferring.
4. Vortex the tubes for 10 seconds and store between 2° and 8°C until the ELISA is performed. Vortex again before transferring diluted specimen to microassay well. This ensures thorough mixing of the specimen.

TEST PROCEDURE

1. Two control wells must be used each time the test is performed. These wells serve as positive and negative controls. One well is needed for each patient sample. Additional control wells are not needed to run a greater number of samples. Add 1 drop (50 µL) of *Conjugate* (red cap) to a positive control well, negative control well, and patient sample well. Hold the *Conjugate* bottle vertically when adding the drops. Identification marks may be written directly on side of well.
2. Add 1 drop (50 µL) of the *Positive Control Reagent* (black cap) to the positive control well and 100 µL of the negative control (i.e., *Diluent*) to the negative control well. Transfer 200 µL of diluted specimen to the test well. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. Cover wells and incubate them at room temperature for 2 hours.
3. Shake out the contents of the assay wells into a discard pan. Wash each well using the diluted *Wash Solution* in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle, directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, then shake the wash

solution out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel and repeat the washing step **four times** using a dry paper towel each time. If any particulate matter is in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed.

NOTE: The *Wash Solution* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1000 mL by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. Label the bottle. Any unused *Wash Solution* should be stored between 2° and 8°C.

4. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate once again onto a dry paper towel until no liquid comes out. *Dispose of paper towels & specimen containers properly.*
5. Add 2 drops (100 µL) of *Substrate* (blue cap) to each well. Gently tap the wells initially and again at 5 minutes to mix the substrate. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes.
6. Add 1 drop (50 µL) of *Stop Solution* (yellow cap) to each well. Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color, which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader. The instrument should be blanked against air. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If a dual reader is used, blank against air at 620 nm and read at 450 nm. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

QUALITY CONTROL

A positive and a negative control must be run with each series of test specimens. Test results should be recorded within 10 minutes of adding the *Stop Solution*. Each positive control well should be an easily visible yellow color and should give an absorbance of 0.500 or higher after the absorbance value of the negative control has been subtracted (see **INTERPRETATION OF RESULTS**). Negative control wells must have an absorbance value of <0.150. Test results are not valid unless the performance characteristics of the positive and negative controls are met. If these results are not observed, call Technical Services.

Any wells that are clear visually but that give a positive reaction (see INTERPRETATION OF RESULTS) should be wiped on the underside and the absorbance should be measured again. Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. Upon arrival, the kit should be inspected to ensure that components are not frozen or warm-to-the-touch due to improper shipping conditions. Test results along with control absorbance values should be recorded and reported according to in-house procedures and should be stored according to in-house procedures for future reference.

INTERPRETATION OF RESULTS

Visual Interpretation

The negative control well should be colorless or have only a faint yellow color. The positive control well should give an obvious yellow color. If these results are not observed, call Technical Services. A test sample is considered positive if it has an obvious yellow color when compared to the negative control well. It may be less yellow or more yellow than the color observed in the positive control well. A test sample is considered negative if the reaction is colorless or less yellow than the negative control well.

Spectrophotometric Interpretation

1. Set the microplate ELISA reader to read at 450 nm. If a dual wavelength reader is used, set the ELISA reader to read at 450 nm and reference at 620 nm.
2. Determine the absorbance value for the negative control. The negative control reading should be 0.150 or less. If not, the test is not valid and should be repeated, paying attention to the wash procedure.
3. Subtract the reading of the negative control well from the readings of the positive control well and test wells before interpreting the results (the microplate ELISA

reader may be set to blank on the negative control well so this step is performed automatically).

4. The reading for the positive control should be 0.500 or higher after the negative control reading has been subtracted. If this value is not obtained, the test should be repeated.
5. A specimen is considered positive for adhesin if the reading is 0.050 or higher after the negative control reading has been subtracted. A specimen is considered negative for the adhesin if the reading is <0.050.
6. A positive test result indicates that *E. histolytica* adhesin is present in the fecal specimen. A negative result indicates that *E. histolytica* adhesin is not present in the fecal specimen.

EXPECTED VALUES

It is estimated that *Entamoeba histolytica* infects about 500 million people around the world (7,8). Roughly 90% of these persons remain asymptomatic, whereas about 10% develop clinical symptoms ranging from gastrointestinal disease to liver abscesses. On average, about 3,500 cases of amebiasis per year are reported to the Centers for Disease Control in the United States (9). High risk groups include persons who have traveled abroad, immigrants, immunocompromised persons, migrant workers, and active male homosexuals (8). Nonpathogenic strains (*E. dispar*) are predominate among male homosexuals (10). The disease often is transmitted by asymptomatic carriers of *E. histolytica*.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In one study, a total of 62 specimens that had been tested by culture/zymodeme and frozen were evaluated in the *E. HISTOLYTICA II*™ test. The *E. HISTOLYTICA II*™ test detected 31 of 32 specimens that were confirmed positives by culture/zymodeme. The remaining 30 specimens were negative both by culture/zymodeme and by the *E. HISTOLYTICA II*™ test, giving a sensitivity and specificity of 96.9% and 100%, respectively. The predictive positive and negative values were 100% and 96.8%, respectively, and the correlation was 98.4%.

In a clinical evaluation performed in Mirpur, Bangladesh, a total of 757 specimens were tested with the *E. HISTOLYTICA II*™ test and the results were compared with culture results for *Entamoeba*. A total of 31 specimens were culture-positive. Zymodeme analysis identified 12 of these as positive for *E. histolytica* and 19 as *E. dispar*. The *E. HISTOLYTICA II*™ test was positive for all 12 *E. histolytica*-positive specimens and negative for 18 of the 19 *E. dispar*-positive specimens. There were 701 fecal specimens that were negative by culture/zymodeme and by the *E. HISTOLYTICA II*™ test. There were 25 specimens that were culture-negative but positive for fecal antigen with the *E. HISTOLYTICA II*™ test. Compared with culture/zymodeme analysis, the *E. HISTOLYTICA II*™ test exhibited a sensitivity and specificity of 100% and 94.7%. The predictive positive and negative values were 92.3% and 100%, and the correlation was 96.8%.

In a third study, a total of 55 specimens were tested in-house at TECHLAB. There were 47 specimens that were spiked with *E. histolytica* trophozoites and 8 that were not spiked. The specimens were assayed with the *E. histolytica* TEST, which is specific for *E. histolytica*, and with the *E. HISTOLYTICA II*™ test. The 47 specimens were positive in both tests and the 8 specimens were negative in both tests. The *E. HISTOLYTICA II*™ test exhibited higher A_{450} readings than the *E. histolytica* TEST. Spectrophotometric readings from both tests correlated 100% with visual readings.

ANALYTICAL SENSITIVITY

The *E. HISTOLYTICA II*™ test detects approximately 0.2 to 0.4 ng per well of adhesin from *E. histolytica*.

REPRODUCIBILITY

The inter-assay variation of the *E. HISTOLYTICA II*™ test was determined by evaluating three positive specimens and three negative specimens. Each specimen was tested each day for five consecutive days. The average inter-assay coefficient of variation for positive specimens was 13.811%. The intra-assay variation was determined by analyzing eight different specimens consisting of four positive (PZ, pathogenic zymodeme) and four negative (NPZ, nonpathogenic zymodeme) specimens. Each specimen was tested in 12 wells. The average intra-assay coefficient of variation for positive specimens was 4.728%.

CROSS-REACTIVITY

The *E. HISTOLYTICA II*™ test was evaluated using fecal specimens found to be positive for a variety of fecal parasites and bacteria. No cross-reactivity was observed with fecal specimens that contained any of the following enteric pathogens: *Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Clostridium difficile, Cryptosporidium* species, *Endolimax* species, *Entamoeba coli, Escherichia coli, Giardia lamblia,* Rotavirus*, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Trichuris trichura.*

LIMITATIONS OF THE *E. HISTOLYTICA II*™

1. The *E. HISTOLYTICA II*™ test detects adhesin in fecal specimens. The test confirms the presence of the organism. This information should be considered by the physician along with the clinical history of the patient.
2. Fecal specimens are complex. Optimal results are obtained with specimens <24 hours old. If specimens are not assayed within this time period, they may be frozen and thawed. However, freezing and thawing, especially multiple times, may cause specimens to lose their activity due to degradation of adhesin.
3. Some specimens may give weak reactions that are inconclusive. This may be due to a number of factors such as the presence of binding substances or inactivating enzymes in the feces. Under these conditions, the specimen should be retested or a fresh specimen should be tested.
4. Additional tests that may be used in conjunction with the *E. HISTOLYTICA II*™ test include visual observation of organisms in preserved specimens. These additional tests, however, do not distinguish *E. histolytica* from *E. dispar*. The *E. HISTOLYTICA II*™ test or zymodeme analysis, which requires culturing and electrophoretic analysis of the isolate, is specific for *E. histolytica*.
5. The magnitude of the absorbance value does not correlate with organism load.
6. The *E. HISTOLYTICA II*™ test has only been validated in a culture positive population.

E. HISTOLYTICA II™ - ESPAÑOL

INDICACIÓN DE USO

La *E. HISTOLYTICA II*™ es un inmunoensayo enzimático para la rápida detección en muestras fecales humanas, de la adhesina de *E. histolytica*. La prueba está indicada para ser utilizada con especímenes fecales de pacientes con diarrea o disentería para determinar la presencia de una infección gastrointestinal causada por *E. histolytica*. La prueba puede ser usada en especímenes fecales de adultos o niños, recibidos para examen clínico de rutina. La microscopía convencional no es un pre-requisito para el uso de la prueba.

Precaución: La Ley Federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo o bajo prescripción médica.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La *Entamoeba histolytica* (antes llamada *E. histolytica* patógena) y la *E. dispar* (antes llamada *E. histolytica* no patógena) son parásitos intestinales que anualmente infectan a aproximadamente medio billón de personas a nivel mundial. Se cree que solamente la malaria y la esquisostomiasis tienen mayor prevalencia como causas parasíticas de morbilidad y mortalidad. Del gran número de personas infectadas, la mayoría están infectadas con *E. dispar*, la cual no ha sido asociada con enfermedad. Se cree que las infecciones con *E. dispar* más que con *E. histolytica,* pueden explicar al menos en parte, la baja tasa de enfermedad considerando la alta tasa de infección. Aun así, se estima que aproximadamente el 10% del medio billón de personas infectadas anualmente, están infectadas con *E. histolytica*. Estos individuos se vuelven sintomáticos y desarrollan colitis y abscesos hepáticos, resultando en una taza de mortalidad estimada entre 40,000 y 120,000 personas anualmente. Es importante distinguir entre estas dos especies porque *E. dispar* no se asocia con colitis o abscesos hepáticos. Además, el diagnóstico inadecuado puede resultar en tratamientos incorrectos e innecesarios con medicamentos agresivos que conllevan efectos secundarios.

Los pacientes infectados con *E. histolytica* patógena pueden exhibir una gran variedad de síntomas. Algunos pacientes son completamente asintomáticos (1-7). Estas personas eliminan millones de quistes diariamente y potencialmente representan un reservorio de diseminación. Algunos pacientes pueden presentar diarrea moderada que se transforma en diarrea sanguinolenta con fuerte dolor abdominal, eventualmente resultando en colitis fulminante. Debido a que puede presentarse daño tisular, como consequencia puede ocurrir perforación del intestino que resulta en la diseminación de la ameba a otras partes del cuerpo. Aproximadamente el 10% de las personas con amiebiasis invasiva desarrollan abscesos hepáticos. El ciclo de vida de *E. histolytica* es similar al de otras amebas. El microorganismo existe como trofozoito o como quiste. Los seres humanos sirven como el principal reservorio, con la diseminación del organismo a traves de la ingestión de comida o agua contaminadas, o por transmisión venérea. El quiste es muy estable. Una vez que ingresa al intestino, comienza a dividirse en trofozoitos que se adhieren a la pared intestinal mediante una lectina de adhesión de galactosa o N-acetil-D-galactosamina, llamada adhesina de galactosa. Una vez que los trofozoitos se han adherido, ellos liberan enzimas de daño tisular y proteínas que lisan las células de la mucosa. Las adhesinas de galactosa de *E. histolytica* y *E. dispar* presentan reacciones serológicas cruzadas pero contienen epítopes distintivos. La adhesina es antigénicamente conservada pero pueden utilizarse anticuerpos monoclonales para distinguir entre las adhesinas de *E. histolytica* y *E. dispar.*

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La prueba *E. HISTOLYTICA II*™ utiliza anticuerpos dirigidos contra la adhesina. Los pocillos de microtitulación contienen anticuerpos policlonales inmovilizados que enlazan la adhesina de *E. histolytica/dispar*. El *Conjugado* es un anticuerpo monoclonal conjugado

con peroxidasa, específico para la adhesina de *E. histolytica*. En el ensayo, una alícuota de la muestra fecal es emulsificada con el *Diluyente* y la muestra diluída es transferida a un pocillo de mitrotitulación. Si la adhesina está presente en la muestra, durante la fase de incubación ésta se adhiere al conjugado y a los anticuerpos policlonales inmovilizados. Cualquier material no adherido es eliminado durante los pasos de lavado. Con la adición del substrato, se desarrolla color debido a la presencia de complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de la adhesina.

MATERIALES PROPORCIONADOS.

DIL | SPE — ***Diluyente,*** 40 mL (solución tampón proteica con 0.02% de timerosal)*. El *Diluyente* también se debe usar como solución control negativa (ver PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA).

CONJ | ENZ — ***Conjugado***, 7.0 mL (anticuerpo monoclonal de ratón, específico para la adhesina de *E. histolytica*; conjugado con peroxidasa de rábano picante y en una solución tampón proteica con 0.02% de timerosal)*

SUBS | REAG — ***Substrato,*** 14.0 mL (solución que contiene tetrametilbenzidina y peróxido)

CONTROL | + — ***Reactivo de Control Positivo,*** 3.5 mL (adhesina purificada de *E. histolytica* en una solución tampón proteica con 0.02% de timerosal)*.

WASHBUF | 20X — ***Tampón de lavado concentrado 20X,*** 50 mL (concentrado 20X que contiene una solución de tampón fosfato salino, detergente y 0.2% de timerosal)*.

Palabra de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P260, P273, P314, P391, P501

H_2SO_4 | 0.6N — ***Solución de parada,*** 7.0 mL (ácido sulfúrico 0.6N). PRECAUCIÓN: evite el contacto con la piel. Si ocurre contacto, lave inmediatamente con agua.

Palabra de advertencia: Peligro

H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA | PLT — ***12 tiras de pocillos de ensayo,*** cada una consite de 8 pocillos recubiertos con anticuerpos policlonales específicos para la adhesina de *E. histolytica* (almacenados con desecante).

1 bolsa plástica resellable ***Hoja plástica adhesiva***

*contiene mercurio (Hg)

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS

Pizeta para el agente de lavado
Refrigerador para almacenaje (2º-8ºC)
Tubos plásticos para diluir las heces
Contenedor de desechos/papel absorbente
1 botella de 1L para la solución diluída de lavado
950 mL de agua deionizada o destilada para diluir la solución de lavado
Lector ELISA capaz de leer a 450 nm o 450/620 nm
Mezclador vórtex
Pipetas plásticas
Tórulas desechables

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional.
3. No se deben mezclar los reactivos de distintos kits. No use un kit pasada su fecha de expiración.

4. Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser usados.
5. Las tapas y puntas están codificadas con colores; no las mezcle!
6. Cuando maneje los pocillos de ensayo, evite rascar el fondo de los pocillos porque esto puede resultar en lecturas de absorbancia elevadas.
7. Sostenga los viales goteros en forma vertical para asegurar el tamaño apropiado de la gota.
8. ***Los pocillos de ensayo sin utilizar, deben guardarse nuevamente dentro de la bolsa resellable con el desecante para protegerlos de la humedad.***
9. Ejecute el procedimiento de lavado tal como se indica para evitar altas reacciones de fondo.
10. Use las muestras fecales dentro de las siguientes 24 horas después de su recolección para obtener óptimos resultados. Los especímenes congelados (-20ºC o menos) pueden perder actividad debido al congelamiento y descongelamiento.
11. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilice guantes desechables para realizar el test.
12. El *Concentrado de tampón de lavado 20X* contiene timerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluida hasta la concentración de uso normal, esta solución se clasifica como no peligrosa. La Solución de Parada contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.
13. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

ALMACENAMIENTO Y MANEJO

La fecha de expiración del kit está indicada en la etiqueta. Las fechas de expiración para cada componente están indicadas en sus etiquetas individuales. El kit debe almacenarse entre 2º y 8ºC, y deberá ser regresado al refrigerador lo antes posible tras su uso.

RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

NOTA: Los procedimientos rutinarios estándares de manejo y recolección de muestras fecales, resultan apropiados. No deben usarse especímenes fecales recolectados o almacenados en fijadores como formol al 10%, formol acetato sódico o alcohol polivinílico. Los especímenes deben ser transportados tan pronto sea posible y almacenados entre 2º y 8ºC.

Si es posible, realize la prueba en muestras fecales con menos de 24 horas. Si la prueba no puede ser ejecutada dentro de las siguientes 48 horas, almacene las muestras a -20ºC, o menos. El congelamiento y descongelamiento de la muestra, especialmente en múltiples ocasiones, puede resultar en la pérdida de actividad debido a la degradación de la adhesina. **Asegúrese que las muestras estén completamente mezcladas (vortex) antes de ejecutar el ensayo. Esto incluye la completa homogenización del especimen antes de transferirlo al *Diluyente*, al igual que la completa homogenización del especimen diluído antes de transferirlo al pocillo de microtitulación.** El *Diluyente* ha sido formulado para estabilizar la adhesina en los especímenes fecales y minimizar su degradación.

1. Prepare un tubo de dilución por cada muestra. Añada 400 µL de *Diluyente* a cada tubo. *Rotule el tubo directamente por un costado.*
2. **Mezcle (vórtex) completamente el especimen para asegurar el correcto muestreo.**
3. Para **heces formadas**, use una tórula para transferir el especimen fecal al tubo. Recubra completamente la tórula antes de transferir el especimen. Mezcle la tórula en el *Diluyente* para remover la mayor cantidad de muestra posible y exprima la tórula contra las paredes del tubo para extraer cualquier líquido residual. Este procedimiento da como resultado la transferencia de aproximadamente 0.15 a 0.20g del especimen. Si no se utiliza la tórula para muestras formadas, transfiera aproximadamente 0.15 a 0.20g de la muestra al *Diluyente* (aproximadamente el tamaño de una arveja/guisante pequeña). Para **muestras líquidas**, transfiera 400 µL del especimen al tubo. Asegúrese que los especímenes líquidos estén resuspendidos homogéneamente (vórtex) antes de transferirlos.

4. Mezcle los tubos con un vórtex por 10 segundos y almacene entre 2º y 8ºC hasta que se ejecute la prueba de ELISA. Mezcle (vórtex) nuevamente antes de transferir el especimen diluído al pocillo de microtitulación. Esto asegura la completa mezcla de la muestra.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

1. Cada vez que se ejecute la prueba se deben utilizar dos pocillos como control. Estos pocillos sirven como controles positivo y negativo. Se necesita un pocillo para la muestra de cada paciente. Cuando se analiza un mayor numero de muestras, no es necesario utilizar pocillos del control adicionales. Agregue 1 gota del C*onjugado* 50 µL (tapa roja) a los pocillos de control positivo, del control negativo y al pocillo con la muestra del paciente. Cuando añada las gotas, sostenga la botella del *Conjugado* en forma vertical. Marcas de identificación pueden ser escritas directamente en los costados de los pocillos.
2. Agregue 1 gota (50 µL) del *Reactivo Control Positivo* (tapa negra) al pocillo de control positivo y 100 µL del control negativo (*Diluyente*) al pocillo del control negativo. Transfiera 200 µL de la muestra diluída al pocillo de prueba. Corte la hoja plástica adhesiva al tamaño necesario para cubrir los pocillos. Cubra los pocillos e incúbelos a temperatura ambiente por 2 horas.
3. Elimine los contenidos de los pocillos de ensayo por inversión rápida dentro de un recipiente de desecho. Lave cada pocillo con la *Solución de Lavado 1X* usando la pizeta con boquilla de punta fina, dirigiendo con fuerza la *Solución de Lavado* al fondo del pocillo. Llene los pocillos, luego elimine por inversión rápida la *Solución de Lavado* dentro del recipiente de desechos. Inverta la placa sobre papel absorbente y repita el paso de lavado **cuatro veces** usando papel absorbente seco en cada ocasión. Si hay material particulado dentro de los pocillos, continúe lavando hasta que todo el material haya sido removido.
   NOTA: El *Tampón de lavado concentrado* es proporcionado como un concentrado al 20X (puede observarse un precipitado). Debe ser diluído hasta un volumen total de 1000 mL mediante la adición de 50 mL del concentrado a 950 mL de agua destilada. Rotule la botella. Almacene cualquier *Solución de Lavado 1X* restante entre 2º y 8ºC.
4. Tras el lavado, remueva completamente el líquido residual de los pocillos golpeando repetidamente la placa invertida sobre papel absorbente seco hasta que no salga mas líquido. *Elimine los papeles y contenedores de especímenes apropiadamente.*
5. Agregue 2 gotas (100 µL) del *Substrato* (tapa azul) a cada pocillo. Golpée suavemente los pocillos para mezclar los contenidos al inicio y de nuevo a los 5 minutos. Incube los pocillos a temperatura ambiente por 10 minutos.
6. Agregue 1 gota (50 µL) de la *Solución de Parada* (tapa amarilla) a cada pocillo. Golpée suavemente los pocillos para mezclar los contenidos. La adición de la *Solución de Parada* convierte el color azul en amarillo el cual puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. El instrumento debe ajustar el blanco con aire. Limpie la parte inferior de cada pocillo antes de medir la densidad óptica. Si se usa un lector de doble haz, ajuste el blanco con aire a 620 nm y lea a 450nm. Lea dentro de los diez minutos siguientes a la adición de la S*olución de Parada*.

CONTROL DE CALIDAD

Con cada serie de pruebas se debe correr un control positivo y un control negativo. Los resultados de las pruebas deben leerse dentro de los 10 minutos siguientes a la adición de la *Solución de Parada*. Cada pocillo de control positivo debe ser de un color amarillo fácilmente visible y deberá dar una absorbancia de 0.500 o mayor después de restar el valor de absorbancia del control negativo (ver **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**). Los pocillos de los controles negativos deben tener un valor de absorbancia de <0.150. Los resultados de la prueba no son válidos a menos que se cumplan las características

de rendimiento de los controles positivos y negativos. Si no se observan estos resultados, llame al Servicio Técnico. Los pocillos que den una lectura positiva sin color visible (ver INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS) deberan ser limpiados en la parte inferior y ser leídos otra vez. Cada componente en el kit debe ser inspeccionado por cualquier signo de derrame. Al arribar, el kit debe ser inspeccionado para asegurarse que los componentes no estén congelados o tibios al contacto, debido a condiciones de transporte inapropiadas. Los resultados de las pruebas, junto con los valores de absorbancia de los controles, deberan ser guardados y reportados de acuerdo a los procedimientos internos y deben ser almacenados para futuras referencias.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Interpretación Visual

El pocillo del control negativo debe ser transparente o tener un color amarillo ligero. El pocillo del control positivo debe dar un color amarillo obvio. Si no se observan estos resultados, llame al Servicio Técnico. Una muestra de prueba es considerada positiva si tiene un obvio color amarillo comparada con el pocillo del control negativo. Puede ser menos o más amarilla que el color observado en el pocillo del control positivo. Una muestra de prueba es considerada negativa si la reacción es incolora o menos amarilla que el pocillo del control negativo.

Interpretación Espectrofotométrica

1. Coloque la microplaca en el lector ELISA para leer a 450 nm. Si se utiliza un lector con doble longitud de onda, programe el lector de ELISA para leer a 450 nm y la referencia a 620 nm.
2. Determine el valor de absorbancia para el control negativo. La lectura del control negativo deberá ser 0.150 o menor. Si no es menor, la prueba no es válida y deberá ser repetida, poniendo atención al procedimiento de lavado.
3. Reste la lectura del pocillo del control negativo de las lecturas de los pocillos del control positivo y pocillos de prueba antes de interpretar los resultados (el lector de microplacas de ELISA puede ser ajustado para utilizar como blanco el valor del pocillo del control negativo, así este paso sera realizado automáticamente).
4. La lectura del control positivo debe ser de 0.500 o mayor después de haber restado el valor del control negativo. Si no se obtienen estos resultados, la prueba deberá repetirse.
5. Un especimen es considerado positivo para la adhesina, si la lectura es de 0.050 o mayor después de haber restado el valor del control negativo. Un especimen es considerado negativo para la adhesina si la lectura es <0.050.
6. Un resultado positivo indica que la adhesina de *E. histolytica* está presente en el especimen fecal. Un resultado negativo indica que la adhesina de *E. histolytica* no está presente en el especimen fecal.

VALORES ESPERADOS

Se ha estimado que *Entamoeba histolytica* infecta a cerca de 500 millones de personas en el mundo (7,8). Aproximadamente el 90% de estas personas permanecen asintomáticas, mientras que el otro 10% desarrolla síntomas clínicos que van desde enfermedad gastrointestinal hasta abscesos hepáticos. En promedio, alrededor de 3,500 casos anuales de amebiasis son reportados al Centro de Control de Enfermedades en los Estados Unidos (9). Los grupos de alto riesgo incluyen a las personas que han viajado al extranjero, inmigrantes, personas inmunosuprimidas, trabajadores migrantes, y hombres homosexuales activos (8). Las cepas no patógenas (*E. dispar*) predominan entre grupos de hombres homosexuales (10). La enfermedad es frecuentemente transmitida por portadores asintomáticos de *E. histolytica*.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

En un estudio, un total de 62 muestras que habían sido analizadas por cultivo/zimodemos y congeladas, fueron evaluadas en la *E. HISTOLYTICA II*™. La *E. HISTOLYTICA II*™ detectó 31 de 32 especímenes que fueron confirmados positivos por cultivo/zimodemos. Los 30 especímenes restantes fueron negativos tanto por cultivo/zimodemos como por la *E. HISTOLYTICA II*™, dando una sensibilidad y una especificidad de 96.9% y 100% respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 100% y 96.8% respectivamente, y la correlación fue de 98.4%.

En una evaluación clínica realizada en Mirpur, Bangladesh, un total de 757 especímenes fueron probados con la *E. HISTOLYTICA II*™ y los resultados fueron comparados con los resultados de cultivo de *Entamoeba*. Un total de 31 especímenes fueron positivos al cultivo. El análisis zimodemos identificó 12 de estos como positivos para *E. histolytica* y 19 para *E. dispar*. La *E. HISTOLYTICA II*™ fue positiva para los 12 especímenes positivos a *E. histolytica* y negativa para 18 de 19 especímenes positivos para *E. dispar*. Hubo 701 muestras fecales que fueron negativas por análisis de cultivo/zimodemos y por la *E. HISTOLYTICA II*™. Hubo 25 especímenes que fueron negativos al cultivo pero positivos para el antígeno en heces con la *E. HISTOLYTICA II*™. Comparada con el análisis de cultivo/zimodemos, la *E. HISTOLYTICA II*™ exhibió una sensibilidad y especificidad de 100% y 94.7%. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 92.3% y 100%, y la correlación fue 96.8%.

En un tercer estudio, un total de 55 especímenes fueron probados internamente en TECHLAB. Hubo 47 especímenes que habian sido inoculados con trofozoitos de *E. histolytica* y 8 que no fueron inoculados. Los especímenes fueron analizados con la PRUEBA *E. histolytica,* la cual es específica para *E. histolytica*, y con la *E. HISTOLYTICA II*™. Los 47 especímenes fueron positivos en ambos estudios y los 8 especímenes fueron negativos en ambas pruebas. La *E. HISTOLYTICA II*™ exhibió lecturas de A_{450} mayores que la PRUEBA *E. histolytica*. Las lecturas espectrofotométricas de ambas pruebas fueron correlacionadas al 100% con lecturas visuales.

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La *E. HISTOLYTICA II*™ detecta aproximadamente 0.2 a 0.4ng de adhesina de *E. histolytica* por pocillo.

REPRODUCIBILIDAD

El coeficiente de variación inter-ensayos de *E. HISTOLYTICA II*™ fue determinado mediante la evaluación de tres especímenes positivos y tres especímenes negativos. Cada especimen fue analizado diariamente por cinco días consecutivos. El coeficiente de variación inter-ensayo promedio para los especímenes positivos fue 13.811%. La variación intra-ensayos fue determinada mediante el análisis de ocho especímenes diferentes consistentes de cuatro especímenes positivos (PZ, zimodemos patógeno) y cuatro negativos (NPZ, zimodemos no patógenos). Cada especimen fue probado en 12 pocillos. El promedio del coeficiente de variación intra-ensayos para especímenes positivos fue 4.728%.

REACCIONES CRUZADAS

La *E. HISTOLYTICA II*™ fue evaluada usando especímenes de heces positivas para una variedad de parásitos y bacterias. No se observaron reacciones cruzadas con especímenes fecales que contenían cualquiera de los siguientes patógenos entéricos: *Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Clostridium difficile, Cryptosporidium spp, Endolimax spp, Entamoeba coli, Escherichia coli, Giardia Lamblia, Rotavirus, Salmonella tiphymurium, Shigella sonnei, Trichuris trichura.*

LIMITACIONES DE LA PRUEBA *E. HISTOLYTICA II*™

1. La *E. HISTOLYTICA II*™ detecta la adhesina en especímenes fecales. El examen confirma la presencia del microorganismo. Esta información debe ser tomada bajo consideración por el médico junto con la historia clínica del paciente.
2. Los especímenes fecales son complejos. Los resultados óptimos se obtienen con especímenes con menos de 24 horas desde su recolección. Si los especímenes no son analizados dentro de este periodo de tiempo, éstos pueden ser congelados y descongelados. Sin embargo, congelar y descongelar, especialmente en múltiples ocasiones, puede causar una perdida de actividad debido a la degradación de la adhesina.
3. Algunos especímenes pueden dar reacciones débiles que no son concluyentes. Ésto puede deberse a un número de factores, tal como la presencia en las fecas de sustancias enlazantes o enzimas inactivantes. Bajo estas condiciones, el especimen debe ser reanalizado o bien se debe analizar una muestra fresca.
4. Las pruebas adicionales que puedan ser usadas en conjunto con la *E. HISTOLYTICA II*™ incluyen la inspección visual de microorganismos en especímenes preservados. Sin embargo, este método no distingue *E. histolytica de E. dispar*. La *E. HISTOLYTICA II*™ o el análisis zimodemos, el cual requiere de cultivo y análisis electroforético del aislamiento, es específico para *E. histolytica.*
5. La magnitud del valor de la absorbancia no se correlaciona con la carga del microorganismo.
6. La *E. HISTOLYTICA II*™ solo ha sido validada en una población positiva al cultivo.

E. HISTOLYTICA II™ - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

E. HISTOLYTICA II™ ist ein Enzymimmunoassay zum schnellen Nachweis des *E. histolytica*- Adhäsins in menschlichen Stuhlproben. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Stuhlproben von Patienten mit Durchfallerkrankungen oder Dysenterie und dient dem Nachweis einer durch *E. histolytica* hervorgerufenen Magen-DarmEntzündung. Das Testverfahren kann in Stuhlproben, sowohl von Erwachsenen als auch von Kindern im Rahmen von routinemäßig durchgeführten klinischen Untersuchungen eingesetzt werden. Die herkömmliche Mikroskopie ist keine Voraussetzung den Einsatz dieses Tests.

Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Entamoeba histolytica (zuvor bekannt als pathogene *E. histolytica*) und *E. dispar* (zuvor bekannt als apathogene *E. histolytica*) sind intestinale Parasiten, die jährlich ungefähr eine halbe Milliarde Menschen weltweit infizieren (1,2). Man vermutet, daß einzig Malaria und Schistosomiasis noch verbreitetere parasitäre Ursachen von Morbidität und Mortalität sind. Von der großen Anzahl infizierter Menschen sind die meisten mit *E. dispar* infiziert, was nicht mit Erkrankung assoziiert ist. Infektionen mit *E. dispar* und nicht mit *E. histolytica* erklären zumindest teilweise die niedrige Sterblichkeitsrate gegenüber der hohen Infektionsrate. Dennoch schätzt man, daß ungefähr 10% der jährlich infizierten halben Milliarde Menschen mit *E. histolytica* infiziert sind. Diese Personen zeigen Symptome und entwickeln Kolitis und Leberabszesse, was eine geschätzte Sterblichkeitsrate von 40.000 bis 120.000 Menschen jährlich zur Folge hat. Es ist wichtig, zwischen diesen beiden Arten zu unterscheiden, denn *E. dispar* ist nicht mit Kolitis oder Leberabszessen assoziiert. Darüberhinaus kann eine Fehldiagnose zu einer ungerechtfertigten und unnötigen Behandlung mit starklen Medikamenten mit Nebenwirkungen führen.

Patienten, die mit pathogener *E. histolytica* infiziert sind, zeigen ein breites Erkrankungsspektrum. Manche sind völlig asymptomatisch (1-7). Diese Menschen scheiden täglich Millionen von Zysten aus und stellen damit ein potentielles Reservoir für weitere Verbreitung dar. Bei einigen Patienten können milde Fälle von Durchfall auftreten, die sich in blutigen Durchfall mit Unterleibskrämpfen, eventuell in fulminante Kolitis weiterentwickeln können. Es kann zur Gewebeschädigung kommen mit Perforation des Darmes als Folge, wodurch sich die Amöben in andere Körperbereichen ausbreiten können. Etwa 10% der Personen mit invasiver Amöbiasis entwickeln einen Leberabszeß. Der Lebenszyklus von *E. histolytica* ähnelt dem, der sich auch bei anderen Amöben beobachten läßt. Der Organismus existiert entweder als Trophozoit oder als Zyste. Menschen dienen als primäres Reservoir, die Infektion erfolgt durch verunreinigte Nahrung und kontaminiertes Wasser oder aber durch Geschlechtsverkehr. Die Zyste ist äußerst stabil. Hat sie den Darm erreicht, beginnt sie, sich in Trophozoiten zu teilen, die sich in der Darmschleimhaut mittels eines Galaktose- oder N-Acetyl-D-Galaktosamin-bindenden Lektins festsetzen, das man Galaktose-Adhäsin nennt. Sobald sich die Trophozoiten festgesetzt haben, setzen sie gewebszerstörende Enzyme und Proteine frei, die Darmzellen lysieren. Die Galaktose-Adhäsine von *E. histolytica* und *E. dispar* sind serologisch kreuzreaktiv, enthalten aber auch deutlich unterschiedliche Epitope. Das Adhäsinantigen ist hochkonserviert, doch durch Einsatz monoklonaler Antikörper können die variablen Epitope des Adhäsins von *E. histolytica* und *E. dispar* unterschieden werden.

TESTPRINZIP

Der *E. HISTOLYTICA II*™ verwendet Antikörper zum Nachweis des Adhäsins. Die Mikrotiterstreifen enthalten immobilisierte polyklonale Antikörper, die Adhäsine von *E. histolytica / dispar* binden. Das *Konjugat* ist ein für das *E. histolytica* Adhäsin spezifischer, monoklonaler, Peroxidase-konjugierter Antikörper. Für den Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe in einem *Verdünnungspuffer* emulgiert, und die verdünnte Probe

in die Vertiefung eines Mikrotiterstreifens übertragen. Falls Adhäsin in der Probe vorhanden ist, bindet es während der Inkubationsphase an das Konjugat und die immobilisierten polyklonalen Antikörper. Alles ungebundene Material wird während des Waschvorgangs entfernt. Nach der Hinzufügung des Substrats wird - aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Zusammensetzung, die sich bei Vorhandensein von Adhäsin bildet eine Färbung sichtbar.

PACKUNGSINHALT

DIL | SPE — ***Verdünnungspuffer***, 40 mL (gepufferte Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal)*. Der *Verdünnungspuffer* wird auch als Negativ-Kontrolle eingesetzt (siehe TESTDURCHFÜHRUNG)

CONJ | ENZ — ***Konjugat***, 7 mL (monoklonaler Antikörper gegen *E. histolytica*-Adhäsin [Maus]; Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal).*

SUBS | REAG — ***Substrat***, 14 mL (tetramethylbenzidin- und peroxidhaltige Lösung).

CONTROL | + — ***Positive Kontrolle***, 3,5 mL (aufgereinigtes Adhäsin von *E. histolytica* in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02% Thimerosal).*

WASHBUF | 20X — ***Waschpuffer-Konzentrat (20X)***, 50 mL (20X Konzentrat, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), Detergenz und 0,2% Thimerosal).*

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition

H411: Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P260, P273, P314, P391, P501

H_2SO_4 | 0.6N — ***Stopplösung***, 7 mL (0,6 N Schwefelsäure). VORSICHT: Hautkontakt vermeiden. Im Falle eines Kontakts sofort mit Wasser spülen.

Signalwort: Gefahr

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA | PLT — ***12 Mikrotiterstreifen*** jeder enthält 8 Kavitäten, die mit polyklonalen Antikörpern gegen *E. histolytica*-Adhäsin beschichtet sind; mit Trockenmittel verpackt.

1 wiederverschließbarer Plastikbeutel ***Klebefolie***

*enthält Quecksilber

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Spritzflasche für die Waschlösung
Kühlschrank für die Lagerung (2º-8º C)
Plastikröhrchen für die Verdünnung von Stuhlproben
Wegwerfbehälter/ saugfähiges Papier
1 l-Flasche für verdünnte Waschlösung
950 mL destilliertes oder demineralisiertes Wasser für die Verdünnung des Waschpuffers
Mikrotiterplatten-Photometer, mit 450 nm- oder 450/620 nm-Filter.
Vortex-Mischer
Plastikpipetten
Einweg-Tupfer

WARNHINWEISE

1. Rx Only - Verschreibungspflichtig
2. *In-vitro*-Diagnostikum. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Reagenzien aus verschieden Kits nicht miteinander mischen. Keine Kits verwenden, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist.
4. Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
5. Verschlüsse und Fläschchen sind farbkodiert; nicht vertauschen.
6. Zerkratzen des Bodens der Versuchskavitäten während der Testdurchführung vermeiden, da dies zu erhöhten Absorptionswerten führen kann.

7. Tropfflaschen senkrecht halten, um die korrekte Tropfengröße zu garantieren.
8. ***Nicht verwendete Mikrotiterstreifen zusammen mit dem Trockenmittel in den wiederverschließbaren Beutel zurückpacken, um sie vor Feuchtigkeit zuschützen.***
9. Waschvorgang wie angegeben durchführen, um hohe Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
10. Für optimale Ergebnisse Stuhlproben innerhalb von 24 Stunden nach dem Sammeln verwenden Bei eingefrorenen Proben (-20º C oder niedriger) kann es aufgrund des Gefrier- und Auftauvorgangs zu einem Aktivitätsverlust kommen.
11. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Kavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
12. Das 20-fache *Waschpufferkonzentrat* enthält 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt ist, wird diese Lösung als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6 N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.
13. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Das Verfallsdatum des Kits ist dem Etikett zu entnehmen. Die Verfallsdaten für jeden einzelnen Bestandteil befinden sich auf individuellen Etiketten. Der Kit sollte zwischen 2º C und 8º C gelagert und nach Gebrauch so bald wie möglich in den Kühlschrank zurückgestellt werden.

SAMMELN UND HANDHABUNG DER PROBEN ACHTUNG: Herkömmliche Sammel- und laborinterne Handhabungsverfahren von Stuhlproben Nachweis von Parasiten sind geeignet. Keine Proben verwenden, die in 10% Formalin-, Natriumacetat-Formalin- oder Polyvinylalkohol-Fixiermedien gesammelt oder gelagert wurden. Die Proben sollten so bald wie möglich transportiert und und zwischen 2º C und 8º C gelagert werden. Nach Möglichkeit Stuhlproben testen, die weniger als 24 Stunden alt sind. Proben bei -20º C oder niedriger lagern, sofern der Test nicht binnen 48 Stunden durchgeführt werden kann. Das Einfrieren und Auftauen der Proben kann besonders bei mehrmaliger Wiederholung wegen des Zerfalls des Adhäsins zu einem Aktivitätsverlust führen. **Vergewissern Sie sich, daß die Proben vor der Durchführung des Versuchs sorgfältig gemischt sind (Vortex-Mischer). Dies gilt für das vollständige Mischen der Proben vor Überführung in den *Verdünnungspuffer* ebenso wie für das komplette Mischen der verdünnten Probe vor der Eingabe in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen.** Der *Verdünnungspuffer* ist derart zusammengesetzt, daß er das Adhäsin in Stuhlproben stabilisiert und seinen Zerfall minimalisiert.

1. Jeweils ein Röhrchen für jede zu testende Probe vorlegen. 400 µL *Verdünnungspuffer* in jedes Röhrchen füllen. *Röhrchen an der Seite beschriften.*
2. **Stuhlprobe sorgfältig mischen (Vortex-Mischer), um vollwertiges Material für den Test zu erhalten.**
3. Bei **festem Stuhl** einen Tupfer für die Überführung der Stuhlprobe in das Röhrchen benutzen. Tupfer in die Probe eintauchen, so daß er vollständig mit Material bedeckt ist. Tupfer in den *Verdünnungspuffer* überführen und gründlich mischen, damit so viel Probenmaterial wie möglich extrahiert wird; anschließend Tupfer an der Innenseite des Röhrchens auspressen, um die restliche Flüssigkeit auszudrücken. Dieser Arbeitsschritt führt zu einer Übertragung von ungefähr 0,15 g bis 0,2 g Stuhlprobe. Wird der Tupfer nicht für festen Stuhl verwendet, etwa 0,15 g bis 0,20 g der Probe (ungefähr die Größe einer kleinem Erbse) in den *Verdünnungspuffer* überführen. Bei **flüssigem Stuhl** 400 µL Probe in das Röhrchen geben. Die flüssigen Proben müssen vor der Übertragung gleichmäßig suspendiert (gemischt) sein.

4. Röhrchen 10 Sekunden lang mischen (Vortex-Mischer) und anschließend zwischen 2º C und 8º C lagern, bis der Test durchgeführt wird. Vor Überführung der Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten erneut vortexen. Dies garantiert eine sorgfältige Verteilung des Probenmaterials.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Für jede Testdurchführung müssen zwei Kontrollkavitäten benutzt werden. Diese Kavitäten dienen der Positiv- und Negativ-Kontrolle. Für jede Stuhlprobe reicht eine Kavität aus. Zusätzliche Kontrollkavitäten sind auch für eine größere Anzahl von Proben nicht notwendig. 1 Tropfen (50 µL) *Konjugat* (roter Verschluß) in jeweils eine Positiv-Kontrollkavität, eine Negativ-Kontrollkavität und eine Stuhlproben-Kavität geben. Fläschchen mit dem *Konjugat* senkrecht halten, wenn die Tropfen hineingegeben werden. Die Beschriftung kann an der Seite der Kavität erfolgen.
2. 1 Tropfen (50 µL) *Positive Kontrolle* (schwarzer Verschluß) in die Positiv-Kontrollkavität und 100 µL Negative Kontrolle (d.h. *Verdünnungspuffer*) in die Negativ-Kontrollkavität geben. 200 µL der verdünnten Proben in die Testkavitäten überführen. Die selbstklebende Plastikfolie auf die entsprechende Größe zur Abdeckung der Kavitäten zuschneiden. Kavitäten abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Inhalt der Versuchskavitäten in eine Abfallwanne schütten. Jede Kavität mit dem verdünnten *Waschpuffer* waschen, wobei eine Spritzflasche mit einer feinen Düse eingesetzt und der Puffer mit größtmöglichem Druck auf den Boden der Kavität gespritzt wird. Die Kavitäten füllen und danach die Waschlösung aus der Kavität in eine Abfallwanne schütten. Die umgedrehten Kavitäten auf einem trockenen Papiertuch ausklopfen. Den Waschvorgang **viermal** wiederholen und jedes Mal ein trockenes Papiertuch benutzen. Bleiben Rückstände irgendwelcher Art in den Kavitäten, so ist der Waschvorgang zu wiederholen, bis alle Rückstände entfernt sind. **ACHTUNG:** Der *Waschpuffer* wird als 20X-Konzentrat geliefert (ein Niederschlag kann sich bilden). Den Inhalt des Fläschchens (50 mL) mit 950 mL destilliertem Wasser mischen, so daß sich eine verdünnte Lösung von 1.000 mL ergibt. In eine Flasche füllen und beschriften. Ungebrauchten *Waschpuffer* bei einer Temperatur zwischen 2º C und 8º C lagern.
4. Nach dem Waschen alle verbleibende Flüssigkeit in den Kavitäten vollständig entfernen, indem die Kavitäten auf einem trockenen Papiertuch so lange ausgeklopft werden, bis diese absolut trocken sind. *Papiertücher und Probenbehälter vorschriftsmäßig entsorgen.*
5. 2 Tropfen (100 µL) *Substrat* (blauer Verschluß) in jede Kavität geben. Vorsichtig gegen die Kavitäten klopfen und ein weiteres Mal nach 5 Minuten, um das Substrat zu mischen. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 1 Tropfen (50 µL) *Stopplösung* (gelber Verschluß) in jede Kavität geben. Vorsichtig gegen die Kavitäten klopfen und 2 Minuten warten, bevor abgelesen wird. Die Zugabe der *Stopplösung* bewirkt, daß die blaue Farbe in gelb umschlägt. Dies kann quantifiziert werden, indem man die optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikroplatten-ELISA-Gerät mißt. Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft. Die Unterseite einer jeden Kavität abwischen, bevor die optische Dichte gemessen wird. Sofern ein Zweifachmeßgerät verwendet wird, erfolgt der Abgleich des Nullwertes gegen Luft bei 620 nm; abgelesen wird bei 450 nm. Die Messungen sollten innerhalb von 10 Minuten nach Hinzugabe der *Stopplösung* erfolgen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jeder Testreihe von Proben muß sowohl eine Positive Kontrolle als auch eine Negative Kontrolle mitgeführt werden. Testergebnisse sind innerhalb von 10 Minuten nach Hinzugabe der *Stopplösung* aufzuzeichnen. Jede Kavität mit Positiv-Kontrolle sollte eine leicht erkennbare gelbe Färbung aufweisen und, nach Abzug des Extinktionswertes der Negativ-Kontrolle (siehe: **AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**), einen Extinktionswert von

0,500 oder höher haben. Kavitäten mit Negativ-Kontrolle müssen einen Extinktionswert von < 0,150 aufweisen. Die Testwerte sind invalide, wenn die Ergebnisse der Positiv- und Negativ-Kontrollen nicht den angegebenen Spezifikationen entsprechen. Weichen die Resultate wiederholt von dem zu erwartenden Ergebnis ab, kontaktieren Sie den zuständigen Außendienstmitarbeiter.

Die Unterseite aller Kavitäten, die visuell klar sind aber eine positive Reaktion anzeigen (siehe: AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE), sollte abgewischt und der Extinktionswert nochmals gemessen werden. Jeder Bestandteil des Kits ist auf Anzeichen von Undichtigkeit zu überprüfen. Nach der Lieferung muß der Kit inspiziert werden, um sicherzugehen, daß der Inhalt nicht gefroren ist oder sich warm anfühlt, was bei inkorrekten Verpackungs-und Versandmethoden der Fall sein kann. Testergebnisse sollten zusammen mit den Extinktionswerten nach den jeweiligen Laborvorschriften aufgezeichnet, dokumentiert und für zukünftige Bezugnahme gespeichert werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Visuelle Auswertung

Die Kavität mit der Negativ-Kontrolle sollte farblos sein oder eine nur schwach gelbliche Färbung aufweisen. Die Kavität mit der Positiv-Kontrolle muß gelb gefärbt sein. Werden diese Resultate wiederholt nicht erzielt, setzen Sie sich mit dem zuständigen Außendienstmitarbeiter in Verbindung. Eine Probe gilt als positiv, wenn sie im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle eine gelbe Färbung aufweist. Sie kann dabei stärker oder schwächer gelb sein als das Gelb in der Positiv-Kontrolle. Eine Testprobe gilt als negativ, wenn die Reaktion farblos oder schwächer gelb ist als die Negativ-Kontrolle.

Spektrophotometrische Auswertung

1. Das Mikrotiterplatten-Photometer auf 450 nm einstellen. Bei Verwendung eines Meßgeräts mit einer doppelten Wellenlängenkapazität, das ELISA-Meßgerät auf 450 nm einstellen und bei 620 nm überprüfen.
2. Den Extinktionswert für die Negativ-Kontrolle ermitteln. Der Wert für die Negativ-Kontrolle sollte bei 0,150 oder niedriger liegen. Ist dies nicht der Fall, dann ist der Test ungültig und muß wiederholt werden; dabei besonders auf den Waschvorgang achten!
3. Die Werte der Negativ-Kontrolle von denen der Positiv-Kontrolle abziehen und die Kavitäten überprüfen, bevor sie ausgewertet werden (das Mikrotiterplatten-Photometer kann auf den Nullwert der Negativ-Kontrolle abgeglichen werden, so daß dieser Schritt automatisch unternommen wird).
4. Der Wert für die Positiv-Kontrolle sollte nach Abzug des Wertes der Negativ-Kontrolle bei 0,500 oder höher liegen. Ist dies nicht der Fall, muß der Test wiederholt werden.
5. Eine Probe gilt als Adhäsin-positiv, wenn ihr Wert nach Abzug des Wertes für die Negativ-Kontrolle bei 0,050 oder höher liegt. Eine Probe gilt als Adhäsin-negativ, wenn ihr Wert nach Abzug des Wertes für die Negative-Kontrolle bei <0,050 liegt.
6. Ein positives Testergebnis ist ein Hinweis dafür, daß die Stuhlprobe *E. histolytica*-Adhäsin enthält. Ein negatives Testergebnis bedeutet, daß die Stuhlprobe kein *E. histolytica*-Adhäsin enthält.

ERWARTUNGSWERTE

Es wird geschätzt, daß *Entamoeba histolytica* etwa 500 Millionen Menschen weltweit infiziert (7,8). Ungefähr 90% dieser Personen weisen keine Symptome auf, wohingegen etwa 10% klinische Symptome entwickeln, die von Magen-Darm-Krankheiten bis zu Leberabszessen reichen. In den Vereinigten Staaten werden den Zentren für Krankheits- und Seuchenkontrolle im Durchschnitt jährlich zirka 3.500 Fälle von Amöbiasis gemeldet (9). Besonders gefährdete Gruppen sind Fernreisende, Immigranten, Personen mit einem schwachen Immunsystem, Gastarbeiter sowie sexuell aktive männliche Homosexuelle (8). Apathogene Formen (*E. dispar*) kommen besonders bei männlichen Homosexuellen vor (10). Die Infektion wird oft durch asymptomatische Träger von *E. histolytica* weiterverbreitet.

LEISTUNGSMERKMALE

In einer Studie wurden 62 Proben, die mit kulturellen Befunden und Zymodem-Analysen getestet worden waren und eingefroren waren, mit dem *E. HISTOLYTICA II*™ ausgewertet. Der *E. HISTOLYTICA II*™ erkannte 31 von 32 Proben als positiv, die anhand kultureller Befunde und Zymodem-Analysen als positiv befundet worden waren. Die restlichen 30 Proben, die sowohl Kultur- als auch Zymodem-negativ waren, zeigten auch im *E. HISTOLYTICA II*™ – negative Ergebnisse (Sensitivität: 96,9%: Spezifität: 100%). Die positiven und negativen Vorhersagewerte lagen bei 100% und 96,9%, und die Korrelation betrug 98,4%.

In einer klinischen Untersuchung in Mirpur in Bangladesch wurden 757 Proben mit *E. HISTOLYTICA II*™ getestet. Die Ergebnisse wurden mit kulturellen *Entamoeba*-Befunden verglichen. 31 Proben waren Kultur-positiv. Eine Zymodem-Analyse identifizierte 12 davon als positiv für *E. histolytica* und 19 als positiv für *E. dispar*. Der *E. HISTOLYTICA II*™ war in allen 12 *E. histolytica* positiven Proben positiv und negativ in 18 der 19 *E. dispar* positiven Proben. 701 Stuhlproben erwiesen sich als negativ hinsichtlich der kulturellen Befunde und der Zymodem-Analyse sowie des *E. HISTOLYTICA II*™. Es gab 25 Proben, die kulturell negativ waren, bei denen aber mit dem *E. HISTOLYTICA II*™ Antigen im Stuhl nachgewiesen werden konnte. Verglichen mit den kulturellen Befunden und der Zymodem-Analyse zeigte der *E. HISTOLYTICA II*™ eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 94,7%. Die positiven und negativen Vorhersagewerte lagen bei 92,3% und 100%, und die Korrelation betrug 96,8%.

In einer dritten Studie wurden 55 Proben im Labor von TechLab getestet. 47 Proben wurden mit *E. histolytica*-Trophozyten versetzt und 8 blieben nativ. Die Proben wurden sowohl dem *E. histolytica* TEST, der ebenfalls spezifisch für *E. histolytica ist,* als auch dem *E. HISTOLYTICA II*™ unterzogen. In beiden Tests waren die 47 Proben positiv und die 8 Proben negativ. Der *E. HISTOLYTICA II*™ wies höhere OD_{450}-Meßwerte auf als der *E. histolytica* TEST. Spektrophotometrische Meßwerte von beiden Tests stimmten zu 100% mit visuellen Auswertungen überein.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Der *E. HISTOLYTICA II*™ weist ungefähr 0,2 bis 0,4 ng *E. histolytica*-Adhäsin pro Kavität nach.

REPRODUZIERBARKEIT

Die Interassay-Varianz des *E. HISTOLYTICA II*™ wurde ermittelt, indem drei positive und drei negative Proben untersucht wurden. Jede Probe wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen täglich getestet. Der durchschnittliche Interassay-Variationskoefizient für positive Proben betrug 13,811%. Die Intraassay-Varianz wurde ermittelt, indem 8 verschiedene Proben analysiert wurden, die 4 positive (PZ, pathogene Zymodeme) und 4 negative (NPZ, apathogene Zymodeme) Proben beinhalteten. Jede Probe wurde in 12 Kavitäten getestet. Der durchschnittliche Intraassay-Variationskoeffizient für positive Proben betrug 4,728%.

KREUZREAKTIVITÄT

Mit dem *E. HISTOLYTICA II*™ wurden Stuhlproben untersucht, die aufgrund des Vorhandenseins zahlreicher Darmparasiten und Bakterien positiv waren. Es konnte keine Kreuzreaktivität bei Stuhlproben festgestellt werden, die eines der folgenden Darmpathogene enthielten: *Ascaris lumbricoides*, *Blastocystis hominis*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium* species, *Endolimax* species, *Entamoeba coli*, *Escherichia coli*, *Giardia lamblia*, Rotavirus, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Trichuris trichura*.

GRENZEN DES *E. HISTOLYTICA II*™

1. Der *E. HISTOLYTICA II*™ weist Adhäsin in Stuhlproben nach. Der Test bestätigt das Vorhandensein des Organismus. Dieser Befund muß vom Arzt im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten betrachtet werden.
2. Stuhlproben sind komplex. Optimale Resultate werden mit Proben erzielt, die weniger als 24 Stunden alt sind. Werden die Proben innerhalb dieses Zeitraums nicht getestet, können sie eingefroren und wieder aufgetaut werden. Allerdings kommt es bei den Proben dabei besonders durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wegen des Zerfalls von Adhäsin zu einem Aktivitätsverlust.
3. Einige Proben können schwach reagieren; diese Tests sind nicht schlüssig. Das kann an einer Reihe von Faktoren liegen, wie beispielsweise an dem Vorhandensein von bindenden Substanzen oder aktivierungshemmenden Enzymen im Stuhl. Unter diesen Bedingungen müssen die Proben entweder nochmals getestet oder frische Proben herangezogen werden.
4. Zusätzliche Tests, die in Verbindung mit dem *E. HISTOLYTICA II*™ durchgeführt werden können, beinhalten visuelle Betrachtung von Organismen in konservierten Proben. Allerdings geben diese zusätzlichen Tests keinen Aufschluß darüber, ob es sich um *E. histolytica* oder *E. dispar* handelt. Die *E. HISTOLYTICA II*™- oder Zymodem-Analyse, die sowohl das Kultivieren als auch eine elektrophoretische Analyse des Isolats erfordert, ist spezifisch für *E. histolytica*.
5. Der Höhe des Extinktionswertes entspricht nicht der Anzahl der Organismen.
6. Der *E. HISTOLYTICA II*™ wurde nur in Kultur-positiven Populationen validert.

E. HISTOLYTICA II™ - FRANÇAIS

UTILISATION PRÉVUE

E. HISTOLYTICA II™ est une analyse immuno-enzymatique pour la détection rapide de l'adhésine de *E. histolytica* dans les spécimens fecaux. Cette analyse est indiquée pour l'utilisation avec des spécimens provenant de patients avec diarrhée ou dysenterie pour déterminer la présence d'une infection gastro-intestinale par *E. histolytica.* L'analyse peut être utilisée pour des spécimens fécaux soumis à des analyses cliniques de routines pour adultes ou enfants. La microscopie conventionnelle n'est pas nécessaire dans le cadre de l'utilisation de cette analyse.

Attention: la loi fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux médecins ou sur prescription médicale.

SOMMAIRE ET EXPLICATION

Entamoeba histolytica (auparavant désignée sous le nom de *E. histolytica* pathogène) et *E. dispar* (auparavant désignée sous le nom de *E. histolytica* non-pathogène) sont des parasites intestinaux qui infectent approximativement un demi-milliard de personnes dans le monde entier annuellement (1,2). Seules la malaria et la schistosomiase sont censées être des causes parasitaires plus répandues de morbidité et de mortalité. Parmis le nombre énorme d'individus infectés, la plupart sont infectés par *E. dispar* qui n'a pas été associé avec la maladie. L'infection par *E. dispar* plutôt que par *E. histolytica* est censée expliquer, du moins en partie, l'incidence faible de la maladie par rapport au nombre élevé d'infections. Cependant, il est estimé qu'approximativement 10% des un demi-milliard d'individus infectés chaque année sont infectés par *E. histolytica*. Ces individus présentent des symtpomes et développent des coliques et des abcès de foie, ayant pour résultat un taux de mortalité estimé entre 40.000 et 120.000 personnes annuellement. Il est important de distinguer entre ces deux espèces pareceque *E. dispar* n'est pas associée avec les coliques ou les abcès de foie. De plus, un diagnostique imprécis peut avoir comme conséquence un traitement injustifié et inutile par des drogues mal tolérées avec effets secondaires.

Les patients infectés par *E. histolytica* pathogène peuvent présenter des conditions variées. Certaines sont complètement asymptomatiques (1-7). Ces individus dispersent des millions de kystes quotidiennement et représentent un reservoir potentiel de dissémination. Certains patients peuvent présenter une diarrhée modérée qui se développe en diarrhée sanglante avec crampes abdominales qui peuvent, éventuellement, produire des coliques fulminantes. À cause de l'endommagement du tissus qui peut en résulter, une perforation de l'intestin peut être produite et l'amibe peut se disseminer dans d'autres parties du corps. Approximativement 10% des individus avec l'amébiose invasive développent un abcès de foie. Le cycle de vie de *E. histolytica* est similaire à celui observé chez d'autres amibes. L'organisme existe soit en tant que trophozoïtes ou alors en tant que kyste. Les humains représentent un reservoir primaire, alors que les organismes se répandent par le biais de la nourriture ingérée et par l'eau contaminée, ou par transmission vénérienne. Le kyste est trés stable. Une fois qu'il est entré dans l'intestin, il commence à se diviser en trophozoïtes qui s'attachent à la muqueuse intestinale par le biais de la galactose ou par la lectine s'attachant au N-acétyl-D-galactosamine designé adhésine du galactose. Une fois que les trophozoïtes se sont attachés, ils relachent des enzymes endommageantes pour le tissus et des protéines qui lysent les céllules muqeuses. Les adhésines du galactose de *E. histolytica* et de *E. dispar* interagissent sérélogiquement mais contiennent des épitodes disctincts. L'adhésine est antigénicalement conservée mais des anticorps monoclonaux peuvent être utilisés pour distinguer l'adhésine de *E. histolytica* et de *E. dispar*.

PRINCIPE DE L'ANALYSE

L'analyse de *E. HISTOLYTICA II*™ utilise des anticorps dirigés contre l'adhésine d'*Entamoeba histolytica*. Les puits de micro-titres sont recouverts de l'anticorps polyclonal qui fixent l'adhésine de *E. histolytica*. Le conjugué est un anticorps monoclonal peroxydase de l'adhésine d'*E. histolytica*. Si l'échantillon emulsifié dans le *Diluant* et déposé dans les puits de micro-titre contenant de l'adhésine d'*E. histolytica*, il se forme un complexe adhésine-conjugé. Ce complexe est immobilisé par l'anticorps polyclonal pendant la phase d'incubation. Le matériel non lié est enlevé pendant les étapes de néttoyage. L'addition du substrat révèle par une réaction colorée la présence des complexes antigène-anticorps-enzyme.

MATÉRIAUX FOURNIS

DIL | SPE — ***Diluant***, 40 mL (solution tampon 0,02% thimérosal).* Le *Diluant* est aussi utilisé comme solution pour le control négatif (voir PROCÉDURE D'ANALYSE)

CONJ | ENZ — ***Conjugué***, 7,0 mL (anticorps de souris monoclonal spécifique pour l'adhésine de *E. histolytica,* attaché à la peroxydase de raifort dans une solution de protéine tampon avec 0,02% thimérosal)*

SUBS | REAG — ***Substrat,*** 14,0 mL (solution contenant tétramethylbenzidine et péroxyde)

CONTROL | + — ***Réactif pour Contrôle Positif***, 3,5 mL (adhésine purifiée provenant de *E. histolytica* dans une solution de protéine tampon contenant 0,02% thimérosal).*

WASHBUF | 20X — ***Tampon de lavage à la Concentration 20X***, 50 mL (concentré 20X contenant du tampon salin aux phosphates, du détergent, et 0,2% thimérosal).*

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée

H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P260, P273, P314, P391, P501

H_2SO_4 | 0.6N — ***Solution d'Arrêt,*** 7 mL, 0,6N d'acid sulfuric. ATTENTION: Éviter tout contact avec la peau; rinser immédiatement en cas de contact.

Mot indicateur : Danger

H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

MA | PLT — ***12 Bandes de Puits d'Analyses*****,** chacune consiste de 8 puits recouverts avec des anticorps polyclonaux spécifiques pour l'adhésine de *E. histolytica* (préserver avec matériel déshydratant)

1 sac rescéllable en plastique ***Feuille adhésive en plastique***

*contient du mercure (Hg)

MATÉRIAUX NÉCÉSSAIRES MAIS NON FOURNIS

Bouteille pour Solution de Nettoyage
Réfrigirateur pour stockage (2° et 8 °C)
Tubes en plastic pour dilution des selles
Récipient pour déchés/papier absorbant
Lecteur Elisa avec filtre à 450 nm ou 450/620 nm
Bouteille de 1-L pour diluer la Solution de Lavage
Mélangeur de vortex
Coton tiges jetables
Pipettes en plastics
950 mL d'eau distillée ou désionisée pour diluer la Solution Tampon de Néttoyage

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Rx Only - Sur ordonnance uniquement
2. Pour une utilisation diagnostique *in vitro*. Uniquement à usage professionnel.
3. Ne pas utiliser des réactifs provenant de kits différents. Ne pas dépasser la date de péremption indiquée sur le kit.

4. Les réactifs doivent être à température ambiante avant utilisation.
5. Les chapeaux et les bouts de pipettes sont codés par couleur: ne les mélangez pas!
6. Quand vous manipulez les puits d'analyses, évitez d'égratiner le fond des puits pareceque des mesures élevées d'absorbance peuvent résulter.
7. La bouteille de compte-gouttes doit être maintenue verticallement pour assurer une goutte de taille appropriée.
8. ***Les micropuits inutilisés doivent être placés à l'interieur de la poche rescéllable avec le déshydratant pour les protéger de l'humidité.***
9. Èxécuter la procédure de nettoyage tel qu'il a été décrit pour éviter des réactions non-spécifques élevées.
10. Utiliser les spécimens de matière fécale durant les premières 24 heures suivant la collection des spécimens afin d'obtenir des résultats optimaux. Les spécimens qui ont été congelés (-20°C ou moins) peuvent perdre leur activité à cause de la congélation et du dégel.
11. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. S'équiper de gants jetables pendant le test.
12. Le *Tampon de lavage concentré 20X* contient du Thimérosal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluée à une concentration normale d'utilisation, cette solution est classée comme non dangereuse. La *Solution d'arrêt* contient 0,6 N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
13. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'échéance du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'échéance pour chaque composant est énumérée sur les étiquettes individuellement. Le kit contenant les réactifs avec les durées de conservation indiquées doit être stocké entre 2 ° et 8°C et doit être retourné au réfrigirateur aussitôt que possible aprés utilisation.

COLLECTION ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

NOTER: Les procédures standard internes de collection et de manipulation utilisées pour les spécimens de selles sont appropriées. Les spécimens qui ont été préservé dans du formal à 10 %, dans du formol d'acétate de sodium ou de l'alcool polyvinylique ne peuvent pas être utilisés. Les spécimens doivent être transportés aussitôt que possible et stockés entre 2° et 8°C. Quand cela est possible, analyser les échantillons qui ont moins de 24 heures. Stocker les spécimens à –20°C ou à des températures moindres si l'analyse ne peut pas être éxécutée suivant les 48 heures aprés la collection de l'échantillon. La congélation et le dégel du spécimen, surtout si cela est répété plusieur fois, peut produire une perte d'activité causée par la dégredation de l'adhésine. Assurez vous que le spécimen ait été complètement mélangé (avec le mélangeur vortex) avant d'entreprendre une analyse. Cela inclue le mélange complet du spécimen avant le transfert au *Diluant* ainsi que le mélange complet du spécimen dilué avant le transfert au micropuit. Le *Diluant* a été formulé afin de stabiliser l'adhésine dans les spécimens fécaux et pour réduire au minimum leur dégradation.

1. Préparer un tube pour la dilution de chaque spécimen analysé. Ajouter 400 µL de *Diluant* à chaque tube. *Marquer le tube directement sur le coté.*
2. **Mélanger complètement (vortex) le spécimen fécal pour garantir un échantillonage adéquat.**

3. Pour les selles formées, utiliser un coton tige pour transférer le spécimen fécal au tube. Couvrir le coton tige comlètement avant de faire le transfert du spécimen. Mélanger le coton tige dans le *Diluant* pour enlever autant d'échantillon que possible et présser le coton tige contre le coté du tube pour extraire le liquide résiduel. Cette procédure produit le transfert d'approximativement 0,15 à 0,20 g de spécimen. Si un coton tige n'est pas utilisé pour les selles formées, transférer approximativement 0,15 à 0,20 g de spécimen (environ de la taille d'un petit pois) au *Diluant*. Pour les **selles liquides**, transférer 400 µL de spécimen au tube. Assurez vous que les spécimens liquides présentent une suspension uniforme (aprés le vortex) avant le transfer.
4. Utiliser le Vortex pour mélanger les tubes pendant 10 secondes et stocker entre 2° et 8°C jusqu'à ce que l'ELISA soit performée. Faire le Vortex encore une fois avant le transfert du spécimen au puit micro-titre. Cela garantie le mélange complet du spécimen.

PROCÉDURE DE L'ANALYSE

1. Deux puits de control doivent être utilisés à chaque fois qu'une analyse est performée. Ces puits sont utilisés comme controls positifs et négatifs. Un puit est nécéssaire pour chaque échantillon de patients. Des controls additionnels ne sont pas nécéssaire pour performer l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Conjugué* (chapeau rouge) à un puit pour le control positif, à un puit pour le control négatif, et à un puit pour l'échantillon du patient. Maintenir la bouteille de *Conjugué* verticalement en ajoutant les gouttes. Des marques d'identification peuvent être écrites directement sur le coté des puits
2. Ajouter 1 goutte (50 µL) du *Réactif pour Contrôle Positif* (chapeau noire) au puit pour control positif et 100 µL du control négatif (c.a.d. le *Diluant*) au puit pour control négatif. Transférer 200 µL du spécimen dilué au puit d'analyse. Couper une feuille adhésive en plastique d'une taille suffisante pour couvrir les puits. Couvrir les puits et incuber les à température ambiante pendant 2 heures.
3. Agiter le contenu hors des puits d'analyse dans le récipient pour déchets. Néttoyer chaque puit en utilisant la *Solution de Nettoyage* diluée dans une bouteille d'éjection à ouverture réduite, en dirigeant la *Solution de Nettoyage* au fond du puit vigoureusement. Remplisser les puits, puis secouer la solution de lavage hors des puits dans un récipient pour déchets.
   Rabattre la plaque inversée sur une serviette en papier sèche et refaites l'étape de nettoyage **quatre fois** en utilisant une serviette en papier sèche à chaque fois.
   NOTER: La *Solution de Nettoyage* est fournie comme concentré 20X (un précipité peut être observé). Elle doit être diluée pour obtenir un volume total de 1000 mL en ejoutant 50 mL du concentré à 950 mL d'eau distillée. Marquer la bouteille. La *Solution de Nettoyage* non utilisée doit être stockée entre 2° et 8°C.
4. Aprés le nettoyage, enlever complètement n'importe quel liquide résiduel dans les puits en rabattant la plaque, une fois encore, sur une serviette en papier sèche jusqu'à ce que tout liquide ait été enlevé. *Disposer des serviettes en papier et des récipients des spécimens d'une manière adéquate*.
5. Ajouter 2 gouttes (100 µL) de *Substrat* (chapeau bleu) à chaque puit. Doucement tapoter les puits au départ puis tapoter encore une fois 5 minutes plus tard pour bien mélanger le substrat. Incuber les puits à température ambiante pour 10 minutes.
6. Ajouter 1 goutte (50 µL) de *Solution d'Arrêt* (chapeau jaune) à chaque puit. Doucement tapoter les puits et attender 2 minutes avant la mesure. L'addition de la *Solution d'Arrêt* convertit la couleur bleu à une couleur jaune qui peut être dosée en mesurant la densité optique à 450 nm ou en utilisant un lecteur microplaque ELISA. L'instrument doit être calibré à son zéro à l'aide d'air. Essuyer le dessous de chaque puit avant de mesurer la densité optique. Si un lecteur de longueur d'onde duel est utilisé, demarquer le zero vis à vis de l'air à 620 nm et mesurer à 450 nm. La mesure doit être obtenue pas plus de dix minutes aprés l'addition de la *Solution d'Arrêt*.

CONTROL DE QUALITÉ

Un control positif et négatif doit être fait avec chaque serie d'analyses de spécimens. Les résultats doivent être enregistrés pendant les 10 première minutes aprés l'addition de la *Solution d'Arrêt*. Chaque puit de control positif doit avoir une couleur jaune visible et doit produire une absorbance de 0,500 ou plus aprés que la valeur de l'absorbance du control négatif ait été soustraite (voir **INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**). Les puits de control négatifs doivent avoir une absorbance de moins de <0,150. Les résultats ne sont pas valides à moins que les caratéristiques de performances du contrôle positif et négatif soient atteintes. Si ces resultats ne sont pas obtenus, appeler les SERVICES TECHNIQUES. N'importe quel puit qui est claire visuellement mais qui produit une réaction positive (voir INTERPRÉTATION DES RESULTATS) doit être éssuyé en dessous et l'absorbance doit être mesurée une fois de plus. Chaque composant du kit doit être inspecté pour s'assurer qu'il n y ait pas eu de fuite. Aprés que le kit soit arrivé, le kit doit être inspecté pour s'assurer que les composants ne sont pas congelés ou chaud au touché à cause des conditions de transports inadéquates. Les résultats des analyses, ainsi que les valeurs de l'absorbance des résultats de controls, doivent être enregistrés et rapportés selon les procédures internes et doivent être stockés selon les procédures internes pour reference future.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le puit de control négatif ne doit présenter aucune couleur ou seulement une couleur jaune trés faible. Le puit de control positif doit produire une couleur jaune positive évidente. Si ces resultats ne se produisent pas, appeler les Services Techniques. Un échantillon d'analyse est considéré positif si il a une couleur jaune évidente en comparaison avec le puit de control négatif. Il peut être plus ou moins jaune que la couleur observée dans le puit de control positif. Un échantillon est considéré négatif si la réaction est sans couleur ou d'une couleur moins jaune que le puit de control négatif.

Interprétation des résultats de spectrophométrie

1. Préparer le lecteur microplaque ELISA pour mesurer à 450 nm. Si un lecteur à longueur d'onde duel est utilisé, préparer le lecteur ELISA pour mesurer à 450 nm et référencé à 620 nm.
2. Déterminer la valeur de l'absorbance pour le control négatif. Le control négatif doit être de 0,150 ou moins. Sinon, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée en faisant bien attention à la procédure de néttoyage.
3. Soustraire la mesure du puit de control négatif à celle du puit de control positif et analyser les puits avant d'interpréter les résultats (le lecteur microplaque ELISA peut être calibré à son zéro en utilisant le puit de control négatif afin que cette étape soit accomplie automatiquement).
4. Le mesurement pour le control positif doit être 0,500 ou plus aprés que le control négatif ait été soustrait. Si cette valeur n'est pas obtenue l'analyse doit être répétée.
5. Un spécimen est considéré positif pour la présence d'adhésine si le mesurement est 0,050 ou plus aprés que le control négatif ait été soustrait. Un spécimen est considéré négatif pour la présence d'adhésine si le mesurement <0,050.
6. Un résultat d'analyse positif indique que l'adhésine de *E. histolytica* est présente dans le spécimen fécal. Un résultat négatif indique que l'adhésine de *E. histolytica* n'est pas présente dans le spécimen fécal.

LES VALEURS ANTICIPÉES

il est estimé que *Entamoeba histolytica* infecte environ 500 million d'individus à travers le monde (7,8). À peu prés 90% de ces individus demeurent asymptomatique, alors qu'à peu prés 10% développent des symptomes cliniques qui s'étendent des maladies gastro-intestinales aux abcès de foie. En moyenne, environ 3.500 cas d'amébiose par an sont reportés au Centers for Disease Control (Centre pour Control des Maladies) aux États-Unis (9). Les groupes à haut risques incluent les individus qui ont voyagé à l'étranger, les immigrés, les individus immuno-compromis, les travailleurs migrants, et les hommes activement homosexuels (8). Les espèces non pathogéniques (*E. dispar*) sont prédominantes parmis les hommes homosexuels (10). La maladie est souvent transmise par des porteurs asymptotiques de *E. histolytica.*

LES CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Dans une étude, un total de 62 spécimens ont été analysés par cultures/zymodèmes et congelés puis evalués par *E. HISTOLYTICA II*™. *E. HISTOLYTICA II*™ a détecté 31 parmis 32 spécimens qui ont été confirmés positifs par cultures/zymodèmes. Les 30 autres spécimens étaient négatifs par détermination par cultures/zymodèmes ainsi que par *E. HISTOLYTICA II*™, indiquatif d'une sensitivité de 96,9% et de 100% respectivement. Les valeurs prédictives positives et négatives etaient 100% et 96,8%, respectivement, et la corrélation etait de 96,8%.

Dans une évaluation clinique exécutée à Mirpur, Bangladesh, un total de 757 spécimens ont été analysés avec *E. HISTOLYTICA II*™ et les résultats ont été comparés avec les résultats des cultures pour Entamoeba. Un total de 31 spécimens étaient positifs par culture. L'analyse par Zymodèmes a identifié 12 de ces positifs pour *E. histolytica* et 19 comme *E. dispar*. *E. HISTOLYTICA II*™ était positif pour la totalité des 12 spécimens positif pour *E. histolytica* et negatif pour 18 parmis les 19 spécimens positifs pour *E. dispar*. Il y avait un total de 701 spécimens de selles qui étaient négatifs par cultures/zymodèmes et par *E. HISTOLYTICA II*™. Il y avait 25 spécimens qui étaient négatifs par la methode des culture mais positifs via les antigènes de selles avec *E. HISTOLYTICA II*™. Comparé à l'analyse avec cultures/zymodèmes, *E. HISTOLYTICA II*™ a éxhibé une sensitivité et une spécificité de 100% et 94,7%. Les valeurs prédictives positives et négatives etaient de 92,3% et 100%, et la corrélation était de 96,8%.

Dans une troisième étude, un total de 55 spécimens ont été testés internement à TechLab. Il y avait 47 spécimens mélangés intentionellement et d'une façon contrôlée avec les trophozoïtes *E. histolytica* et 8 n'ont pas été contaminés. Les spécimens ont alors été analysés avec le *E. histolytica* TEST, qui est spécifique pour *E. histolytica*, de même qu'avec *E. HISTOLYTICA II*™. Les 47 spécimens étaient positifs avec les deux types d'analyses et les 8 spécimens étaient négatifs avec les deux types d'analyses. *E. HISTOLYTICA II*™ a éxhibé des mesures A_{450} plus importantes que celles éxhibées par *E. histolytica* TEST. Les mesures par spectrophotométrie pour les deux analyses ont corrélé à 100% avec les mesures visuelles.

SENSITIVITÉ ANALYTIQUE

E. HISTOLYTICA II™ détecte approximativement entre 0.2 et 0.4 ng par puit d'adhésine provenant *E. histolytica*.

REPRODUCTIBILITÉ

La variation inter-analyse de *E. HISTOLYTICA II*™ a été determinée en évaluant trois spécimens positifs et trois spécimens négatifs. Chaque spécimen a été analysé chaque

jour pour cinq jours consécutifs. La moyenne du coéfficient de variation inter-analyse pour les spécimens positifs étaient de 13,811%. La variation intra-analyse a été déterminée par l'analyse de huit spécimens différents se composant de quatre positifs (ZP, zymodème pathogénique) et quatre négatifs (ZNP, zymogène non pathogénique) spécimens. Chaque spécimens a été analysé dans 12 puits. La moyenne du coéfficient de variation d'intra-analyse pour les spécimens positifs étaient de 4,728%.

LES RÉACTIONS NON-SPÉCIFIQUES

E. HISTOLYTICA II™ a été évaluée en utilisant des spécimens de selles qui ont été déterminés positifs pour une variété de parasites fécaux et de bactéries. Les spécimens de selles qui contenaient les pathogènes entériques suivant n'ont pas interagis: *Ascaris lumbricoides, Blastocystis hominis, Clostridium difficile,* espèces *Cryptosporidium*, espèces *Endolimax*, *Entamoeba coli, Escherichia coli, Giardia lamblia,* Rotavirus*, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Trichuris trichura.*

LIMITATIONS DE *E. HISTOLYTICA II*™

1. *E. HISTOLYTICA II*™ détecte l'adhésine dans les spécimens fécaux. L'analyse confirme la
   présence de l'organisme. Cette information doit être considérée par un médecin avec l'histoire clinique du patient.
2. Les spécimens fécaux sont complexes. Des résultat optimaux sont obtenus avec des spécimens ayant moins de 24 heures. Si les spécimens ne sont pas analysés durant cette période, ils peuvent être congelés et decongelés. Cependant, congeler et décongeler, surtout de façon répétée, peut produire une perte d'activité des spécimens causée par la dégradation de l'adhésine.
3. Certains spécimens peuvent produire des réactions faibles qui sont ambigues. Cela peut être due à plusieurs facteurs comme la présence d'agents liants ou d'enzymes d'inactivantes présents dans les résidus. Sous ces conditions, le spécimen doit être reanalysé ou un spécimen frais doit être analysé.
4. Des analyses additionnelles qui peuvent être utilisées en conjonction avec *E. HISTOLYTICA II*™ incluent l'observation visuelle de l'organisme dans les spécimens préservés. Ces analyses additionnelles, cependant, ne discernent pas entre *E. histolytica* et *E. dispar. E. HISTOLYTICA II*™ ou l'analyse par zymodème, qui demande une cultivation et une analyse lectrophorétique de l'isolé, est spécifique pour *E. histolytica*.
5. L'importance de la valeur de l'absorbance ne se corrèle pas avec le nombre d'organismes.
6. *E. HISTOLYTICA II*™ *a seulement été validé parmis une population de culture positive.*

BIBLIOGRAPHY

1. Gathiram, V., and T. F. H. G. Jackson. 1987. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. South Afr. Med. J. 72:669-672.
2. Haque, R., K. Kress, S. Wood, T. Jackson, D. Lyerly, T. Wilkins, and W. A. Petri, Jr. 1993. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. J. Infect. Dis. 167:247-249.
3. Irusen, E. M., T. F. H. G. Jackson, and A. E. Simjee. 1992. Asymptomatic intestinal colonization by pathogenic *Entamoeba histolytica* in amebic liver abscess: prevalence, response to therapy, and pathogenic potential. Clin. Infect. Dis. 14:889-93.
4. Petri, W. A., Jr., T. F. H. G. Jackson, V. Gathiram, K. Kress, L.D. Saffer, T. L. Snodgrass, M. D. Chapman, Z. Keren, and D. Mirelman. 1990. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. Infect. Immun. 58:1802-1806.
5. Sargeaunt, P. G., J. E. Williams, and J. D. Grene. 1978. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 72:519-521.
6. Sargeaunt, P. G., and J. E. Williams. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amebae of man. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 73:225-227.
7. Walsh, J. A. 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8:228-238.
8. Bruckner, D. A. 1992. Amebiasis. Clin. Microbiol. Rev. 5:356-369.
9. Krogstad, D. J., H. C. Spencer, G. R. Healy, N. N. Gleason, D. J. Sexton, and C. A. Herron. 1978. Amebiasis: epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. Ann. Intern. Med. 88:89-97.
10. Tannich, E., and G. D. Burchard. 1991. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. J. Clin. Microbiol. 29:250-255.

Technical Support
Further information can be obtained by contacting TECHLAB® Technical Support:

US	+ 1 800 TECHLAB
Phone	(540) 953-1664
Fax	(540) 953-1665
Email	ts@techlab.com

© 2023 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

E. HISTOLYTICA II, the TECHLAB Logo and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc.