RIDASCREEN® Entamoeba

N.º producto: C1701

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 - 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20

1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® Entamoeba es un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en muestras de heces humanas.

2. Resumen y descripción del ensayo

Hasta 500 millones de personas se infectan con *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* en todo el mundo cada año. Los análisis genéticos moleculares han demostrado que estos protozoos, que se identificaron mediante métodos de diagnóstico tradicionales y se denominaron *Entamoeba histolytica*, son dos especies distintas con una morfología que no puede diferenciarse. Una es la especie patógena *Entamoeba histolytica* y la otra es *Entamoeba dispar*, que no es patógena según el estado actual de los conocimientos.

Los síntomas clínicos de la amebiasis comienzan cuando el parásito procedente del lumen intestinal invade la membrana mucosa del colon, donde a menudo pueden observarse trofozoítos con eritrocitos fagocitados. Debido a su tamaño, estos trofozoítos se conocen como forma magna. Las consecuencias de la invasión de la mucosa intestinal son diarrea, disentería e incluso ameboma. Después de la diseminación, las posibles complicaciones abarcan abscesos en el hígado, en los pulmones y, muy rara vez, incluso en el cerebro, a menudo con desenlace fatal si la enfermedad no recibe tratamiento.

Los síntomas clínicos de la forma intestinal aguda de la amebiasis son dolorosos cólicos abdominales acompañados de náuseas y diarrea grave, con sangre y mucosa en las heces. La fase aguda de la enfermedad puede evolucionar a un estado crónico caracterizado por diarreas ocasionales alternadas con estreñimiento, dolor abdominal, náuseas y vómitos. La literatura incluye descripciones de portadores completamente asintomáticos de los quistes.

Los sensibles métodos de ensayo inmunológicos, como el ELISA RIDASCREEN® con anticuerpos específicos anti-adhesina, tienen muchas más ventajas que la microscopía para la identificación directa de los patógenos. La adhesina específica de Entamoeba es una proteína de superficie que se une específicamente a la galactosa o N-acetil-galactosamina de los eritrocitos del huésped y facilita la posterior invasión del patógeno mediante la lisis de estas células.

Aproximadamente el 10% de todos los casos de disentería amebiana aguda tienen secuelas en forma de complicaciones extraintestinales, como abscesos en el hígado o la infestación de otros órganos. La identificación de anticuerpos mediante serología es el método indicado en el caso de las amebiasis extraintestinales.

Este método realiza el diagnóstico independientemente de la evaluación subjetiva y es más sensible en cuanto a la detección de partes que no pueden identificarse morfológicamente. Los títulos de anticuerpos pueden determinarse normalmente en el instante en que comienzan los signos y síntomas clínicos y la identificación inmediatamente posterior de anticuerpos específicos permite identificar *E. histolytica*. De este modo, es posible diferenciar asimismo

entre los niveles de títulos de amebiasis intestinal y extraintestinal, una distinción importante a la hora de elegir los tratamientos.

3. Principio de ensayo

En el test RIDASCREEN® Entamoeba se utilizan anticuerpos específicos según el método tipo sandwich. La superficie de los pocillos de la placa está recubierta con anticuerpos específicos contra los antígenos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar.* Una suspensión de la muestra de heces analizada y las muestras control se pipetean en los pocillos de la placa junto con anticuerpos anti-Entamoeba biotinilados (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). En las muestras que contienen anticuerpos anti-Entamoeba, los anticuerpos inmovilizados, el antígeno de Entamoeba y los anticuerpos conjugados forman un complejo tipo sandwich. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de antígenos de Entamoeba presentes en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales específicos contra *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*
Diluent | 1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salida tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0,1%
Control | +	2 ml	Antígeno de Entamoeba inactivado; listo para usar
Control | -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar
Conjugate | 1	13 ml	Anticuerpos conjugados con biotina contra antígenos de Entamoeba en solución proteica estabilizada; listo para usar, colo verde
Conjugate | 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar

Stop	8 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 - 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.
Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas inmediatamente a 2 - 8 °C.
El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos suministrados

– Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

– Tubos de ensayo
– Pipetas desechables (ref. Z0001)
– Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
– Micropipeta de 50 - 100 µl y 1 ml
– Probeta (1.000 ml)
– Cronómetro
– Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
– Fotómetro para placas de pocillos (450 nm y filtro de referencia de 620 - 650 nm)
– Papel de filtro (toallas desechables)
– Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5 %

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.
No pipetear las muestras y los reactivos con la poca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al

manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras. Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El kit incluye un control positivo que contiene el antígeno de Entamoeba inactivado. Debe tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales, igual que las muestras de los pacientes.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Guardar el material del ensayo a 2 - 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a -20 °C. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a –20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente.
No guardar las muestras de heces y los frotis rectales en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Entamoeba.
En caso de utilizar frotis rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.
La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

9. Procedimientos de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y la placa de pocillos Plate deben adquirir temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de utilizarlos. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 – 8 °C. Desechar las tiras de pocillos usadas. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos en caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.
Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los

componentes del kit. No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o el precinto con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado Wash con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

9.3. Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® Diluent | 1. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión.
Para suspender una muestra de heces sólida, utilizar una cantidad equivalente (aprox. 50 - 100 mg) de la muestra con una espátula o un asa de siempre desechable.
Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice.
Dejar reposar brevemente la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante debe estar libre de partículas. En este caso, es aconsejable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

Nota:
Las muestras de heces diluidas en Diluent | 1 pueden emplearse en cualquier otro ELISA RIDASCREEN® que utilice también el Diluent | 1.

9.4. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, pipetear 100 µl del control Control | + positivo, del control Control | - negativo o de la suspensión de muestras de heces a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina Conjugate | 1 y mezclar (golpeado suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 30 minutos.

9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa local en materia de eliminación de residuos. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A

continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados.

A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina Conjugate | 2 en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 min.

9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato Substrate. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada Stop con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

Nota:
En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se realiza correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (O.D.) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado. Si no se

cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:
- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

Corte = extinción del control negativo + 0,15

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Entamoeba sirve para identificar los antígenos de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los síntomas clínicos.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de amebiasis. Este resultado puede deberse a la excreción intermitente del patógeno o a que la cantidad de antígeno en la muestra sea demasiado pequeña. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección con

Entamoeba histolytica, deberá repetirse la prueba con una muestra de heces diferente. Si existen razones para sospechar una amebiasis extraintestinal, la sospecha puede confirmarse mediante la identificación de anticuerpos específicos contra *Entamoeba histolytica* en suero (RIDASCREEN® E. histolytica IgG, ref. K1721).

Un resultado **límite** puede deberse a la distribución no homogénea de los antígenos en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

13. Rendimientos

13.1 Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del ELISA RIDASCREEN® Entamoeba se preparó una serie lineal de diluciones a partir de una muestra con una cantidad conocida de quistes de Entamoeba y se realizaron mediciones por triplicado. El límite de detección (LoD) es la última concentración que se evalúa como positiva en todas las réplicas. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados de sensibilidad analítica para *Entamoeba histolytica* en el ELISA RIDASCREEN® Entamoeba

	E. histolytica		***E. dispar***	
	MV [DO 450/620]	**Quistes/reacción**	**MV [DO 450/620]**	**Quistes/reacción**
LoD	0,173	17	0,200	595

13.2. Comparación con producto de la competencia

Muestras de heces previamente diagnosticadas (10 positivas para Entamoeba y 30 negativas para Entamoeba) se analizaron con el test RIDASCREEN® Entamoeba y se compararon con un ELISA de la competencia. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Comparación del ELISA RIDASCREEN® Entamoeba con un ELISA de la competencia utilizando muestras de heces

		Competidor	
		Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Entamoeba	Positivo	10	0
	Negativo	0	30

Coincidencia: 100 %

Asimismo, se preparó una dilución seriada a partir de cepas certificadas de *E. histolytica* para un estudio comparativo entre el ELISA RIDASCREEN® Entamoeba y dos productos de la competencia. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Comparación entre el ELISA RIDASCREEN® Entamoeba con dos ELISA de la competencia utilizando una mezcla de cepas de *Entamoeba histolytica*

E. histolytica	**RIDASCREEN® Entamoeba** MV [DO 450/620]	**ELISA 1** MV [DO 450/620]	**ELISA 2** MV [DO 450/620]
Cepa HM1:IMSS			
1:10	2,428 **+++**	3,734 **+++**	2,533 **+++**
$1:10^2$	3,840 **+++**	3,566 **+++**	1,806 **+++**
$1:10^3$	3,885 **+++**	0,514 **-**	0,894 **++**
$1:10^4$	3,678 **+++**	0,015 **-**	0,313 **+**
$1:10^5$	2,528 **+++**	-0,003 **-**	0,208 **+**
$1:10^6$	0,890 **++**	-0,006 **-**	0,146 **+**
Cepa HK9			
1:10	3,129 **+++**	3,493 **+++**	2,084 **+++**
$1:10^2$	3,594 **+++**	3,397 **+++**	1,498 **++**
$1:10^3$	3,683 **+++**	0,750 **++**	0,668 **++**
$1:10^4$	3,520 **+++**	0,050 **-**	0,251 **+**
$1:10^5$	1,695 **+++**	-0,004 **-**	0,152 **+**
$1:10^6$	0,696 **++**	-0,003 **-**	0,121 **-**
Cepa 200:N1H			
1:10	2,269 **+++**	3,514 **+++**	2,654 **+++**
$1:10^2$	3,601 **+++**	3,464 **+++**	1,975 **+++**
$1:10^3$	3,638 **+++**	2,616 **+++**	1,245 **++**
$1:10^4$	3,672 **+++**	0,327 **+**	0,444 **+**
$1:10^5$	3,239 **+++**	0,055 **-**	0,236 **+**
$1:10^6$	0,996 **++**	0,003 **-**	0,138 **+**

DO 450/620 ≥ 1,5: **+++** DO 450/620 = 0,5 - 1,5: **++**
DO 450/620 < 0,5: **+** DO 450/620 < valor de corte : **-**

13.3. Reactividad cruzada

Se estudiaron diferentes organismos patógenos del tracto intestinal con el ensayo RIDASCREEN® Entamoeba y, excepto *Campylobacter coli*, no mostraron reactividad cruzada.

Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias o virus no diluidas con concentraciones de 10^6 a 10^9 organismos por ml. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Organismo	Origen	[DO 450/620] Valor medio
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,002
Aeromonas hydrophila	Cultivo	-0,005
Arcobacter butzleri	Cultivo	0,008
Astrovirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,001
Bacillus cereus	Cultivo	0,003
Bacteroides fragilis	Cultivo	-0,005
Campylobacter coli	Cultivo	0,196
Campylobacter jejuni	Cultivo	0,017
Candida albicans	Cultivo	0,019
Citrobacter freundii	Cultivo	0,016
Clostridium difficile	Cultivo	0,042
Clostridium perfringens	Cultivo	0,006
Clostridium sordellii	Cultivo	0,007
Cryptosporidium muris	Cultivo	0,002
Cryptosporidium parvum	Cultivo	0,006
E. coli (O26:H-)	Cultivo	-0,002
E. coli (O6)	Cultivo	0,026
E. coli (O157:H7)	Cultivo	0,020
Enterobacter cloacae	Cultivo	0,002
Enterococcus faecalis	Cultivo	0,000
Giardia lamblia	Heces	0,004
Klebsiella oxytoca	Cultivo	0,032
Proteus vulgaris	Cultivo	0,003
Pseudomonas aeruginosa	Cultivo	0,002
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,003
Salmonella enteritidis	Cultivo	-0,004
Salmonella typhimurium	Cultivo	0,004
Serratia liquefaciens	Cultivo	-0,004
Shigella flexneri	Cultivo	0,018
Staphylococcus aureus	Cultivo	0,015

Staphylococcus epidermidis	Cultivo	-0,001
Vibrio parahaemolyticus	Cultivo	-0,002
Yersinia enterocolitica	Cultivo	0,001

13.4. Precisión

Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias, representativas del rango de medición completo, desde negativo a positivo alto. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes de los kits. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo diferentes, con dos ensayos por día. Las medidas fueron realizadas por tres técnicos sobre tres lotes de los kits. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Reproducibilidad y precisión del ELISA RIDASCREEN® Entamoeba

Referencia		**Intraensayo**			**Interensayo**			**Interlote**
		Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1-3
1	MV [DO 450/620]	1,901	1,402	1,465	1,581	1,707	1,507	1,598
	CV (%)	**6,07%**	**8,39%**	**5,91%**	**17,00%**	**16,70%**	**18,71%**	**18,17%**
2	MV [DO 450/620]	1,375	1,095	1,209	1,155	1,253	1,124	1,177
	CV (%)	**5,82%**	**7,45%**	**5,74%**	**13,71%**	**14,97%**	**16,25%**	**15,74%**
3	MV [DO 450/620]	1,091	0,976	0,810	0,933	1,010	0,869	0,937
	CV (%)	**5,31%**	**10,58%**	**6,07%**	**16,20%**	**15,17%**	**14,00%**	**16,68%**
4	MV [DO 450/620]	0,606	0,532	0,512	0,507	0,556	0,461	0,508
	CV (%)	**5,45%**	**6,44%**	**7,93%**	**19,52%**	**14,33%**	**17,21%**	**19,08%**
5	MV [DO 450/620]	0,350	0,325	0,204	0,306	0,330	0,276	0,304
	CV (%)	**6,61%**	**12,20%**	**16,90%**	**19,78%**	**17,50%**	**21,16%**	**20,92%**
6	MV [DO 450/620]	-0,001	-0,002	0,000	0,012	0,001	0,005	0,006
	CV (%)	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**

13.5 Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con los sobrenadantes de muestras de heces positivas y negativas para Entamoeba en las concentraciones descritas:
loperamida (antidiarreico; 0,02% p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 6,6% v/p), mucinas (5,0% p/p), ciclamato (edulcorante, 1,3% v/p), sangre humana (5,0% v/p), ácido esteárico y ácido palmítico (mezcla 1:1, 40,0% p/p), metronidazol (0,5% solución v/p), diclofenaco (0,1 % v/p).
Se investigó una posible relación dosis-efecto para el sulfato de bario (18,5% p/p). En este análisis de una dilución seriada con sulfato de bario no pudo comprobarse, sin embargo, la existencia de una relación directa entre la concentración y los valores de DO. La única excepción es la concentración más alta estudiada, más alta incluso que la concentración "en el peor de los casos" y que ya se ensayó en el primer análisis (tres veces la dosis diaria). Por consiguiente, puede considerarse improbable la interferencia debido al sulfato de bario.

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent | 1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control | +	Control positivo
Control | -	Control negativo
Conjugate | 1	Conjugado 1
Conjugate | 2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografía

1. Bracha, R. et al.: Differentiation of clinical isolates of Entamoeba histolytica by using specific DNA probes. Clin. Microbiol. 28 (No. 4), 680 - 684 (1990).
2. Citronberg, R. J., Semel, J. D.: Severe vaginal infection with Entamoeba histolytica in a woman who recently returned from Mexico: Case report and review. Clin. Infect. Dis. 20, 700 - 702 (1995).
3. Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A.: Entamoeba histolytica: Mechanism of surface receptor capping. Exp. Parasitol. 79, 424 - 435 (1994).
4. Katzwinkel-Wladarsch, S. et al.: Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica DNA from stool specimen. Am. J. Trop. Med.-Hyg. 51 (1), 115 - 118 (1994).
5. Kean, B. H. et al.: Epidemic of amoebiasis and giardiasis in a biased population. Brit. J. Ven. Dis. 55, 375 - 378 (1979).
6. Mannweiler, E.: Immundiagnostik der Amöbiasis. Der Mikrobiologe 5. Jg., Heft 6, 194 - 200 (1995).
7. Ohnishi, K. et al.: Brain abscess due to infection with Entamoeba histolytica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51 (2), 180 - 182 (1994).
8. Petter, R. et al.: Characterization of two distinct gene transcripts for ribosomal protein L 21 from pathogenic and nonpathogenic strains of Entamoeba histolytica. Gene 150, 181 - 186 (1994).
9. Reed, Sh. L.: New Concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. Clin. Infect. Dis. 21 (Suppl. 2), 182 - 185 (1995).
10. Strachan, W. D. et al.: Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of Entamoeba histolytica. Lancet 12, 561 - 563 (1988).
11. van Lunzen, J., Tannich, E., Burchard, G.-D.: Amöbenruhr und Amöbenleberabszeß. Deutsches Ärzteblatt 93, Heft 2, 2659 - 2665 (1996).