

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la equinococosis alveolar humana

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9300

N° CE: H-CH/CA01/IVD/01757



Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de la equinococosis alveolar en el ser humano y confirmación de sospechas clínicas. Control postoperatorio. Vigilancia epidemiológica en poblaciones y de personas consideradas con riesgo.

Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos sensibilizados con antígenos Em2-Em18 de *Echinococcus multilocularis*. La presencia de anticuerpos séricos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Los pocillos individuales sensibilizados, permiten de realizar pequeñas series de muestras.

Material que contiene el kit (96 pruebas):

WELL	9300-01	Pocillos sensibilizados con antígenos Em2-Em18 de <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	pocillos
DILB	9300-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
WASH	9300-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
ENZB	9300-04	Tampón de la enzima	50	ml
STOP	9300-05	Solución de parada (K_3PO_4)	25	ml
CONTROL -	9300-06	Suero de control negativo	200	μ l
CONTROL -/+	9300-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	μ l
CONTROL +	9300-08	Suero de control positivo	200	μ l
CONJ	9300-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	μ l
SUBS	9300-10	Substrato de la fosfatasa	20	tabletas
		Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml	1	pieza
		Cuadro para el soporte de los pocillos	1	cuadro

Conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8° C (el transporte a temperatura ambiente). La fecha de caducidad y el número de lote de producción son escritos en un costado de la caja.

Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas (μl y ml). Recipientes. Tubos para la dilución des sueros. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a 37°C . Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de 405nm .

Preparación de reactivos antes de la utilización:

Pocillos sensibilizados: Abrir el embalaje en aluminio 9300-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos. Poner los pocillos en el soporte. Si es necesario completar las posiciones no utilizadas con pocillos ya utilizados. Disponer el soporte en el cuadro respetando la orientación. Mantenga los pocillos no utilizados sellados en la bolsa con el desecante.

Tampón de dilución: diluir el tampón de dilución concentrado 10 x 9300-02, 1/10 en agua destilada.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9300-03, 1/10 en agua destilada. Si usted desea utilizar su propia solución de lavado, evite tampones que contienen fosfato, lo cual podría inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.

Sueros de control negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo: diluir 10 μl de cada suero de control 9300-06 a -08 en 190 μl de tampón de dilución (dilución final: 1/20).

Sueros de pacientes: diluir 10 μl de suero en 2.0 ml de tampón de dilución (dilución final: 1/201).

Conjugado proteína A-fosfatasa alcalina: diluir el conjugado 9300-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

Solución de sustrato: equilibrar el tampón de la enzima 9300-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9300-10 en el tampón de la enzima 9300-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto.

Solución de parada: utilizar el reactivo 9300-05 no diluido.



Precauciones de uso: Las soluciones 9300-02, 9300-03, 9300-04 y 9300-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio (Na_3N_3). La solución 9300-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9300-05 ($0.5\text{ M K}_3\text{PO}_4$) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9300-06 a -08) son sueros de conejo.

Volúmenes a preparar:

			Cantidad de pocillos a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampón de dilución (10 x)	9300-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	9300-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9300-09 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	9300-06 à -08 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sueros a analizar	suero + tampón de dilución	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Sol. de sustrato	9300-10 + 9300-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedimiento:

Etapas 1: Bloqueo:

Llenar completamente los pocillos con la solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos a temperatura ambiente (bloqueo de los pocillos).

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

Etapas 2: Incubación con las muestras de suero a analizar:

Llenar el primer pocillo de la tira con 100 µl de tampón de dilución (Blanco sin suero)

Llenar los 3 pocillos siguientes con 100 µl de sueros de controles diluidos (suero negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo).

Llenar los otros pocillos con los sueros a analizar diluidos (100 µl).

Cubrir los pocillos con un film adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con la solución de lavado.

Etapas 3: Incubación con el conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado proteína A-fosfatasa diluido en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con la solución de lavado.

Etapas 4: Incubación con el sustrato:

Distribuir 100 µl de la solución del sustrato en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Parar la reacción en adicionando 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.

Etapas 5: Medida de la densidad óptica:

Limpiar la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente, eliminar las burbujas de aire en caso de necesidad y proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm.

Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen: DO del control positivo >1.200, DO del control negativo <15% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo (cut off) 9300-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de equinococosis alveolar y los sueros de sujetos sanos.

El resultado es **negativo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es menor que la del suero cut off 9300-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos Em2-Em18 de *Echinococcus multilocularis* no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es mayor que la del suero cut off 9300-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos Em2-Em18 de *Echinococcus multilocularis* es considerado como clínicamente significativo.

Sensibilidad y especificidad de la prueba:

Una sensibilidad diagnóstica de 83% ha sido observada en un grupo de 151 pacientes infectados por *E. multilocularis*. Los casos de hydatidosis (*E. granulosus*) son negativos con esta prueba en 84% de los casos (n=63).

La especificidad de la reacción en relación a otras parasitosis es de 93% en pacientes que sufren de helmintiasis (n=46). La especificidad de la reacción con sueros de pacientes donadores de sangre (suizos) es de 98% (n=267). Un estudio interno ha demostrado que los sueros lipémicos, ictericos o hemolizados no representan un problema para la realización de esta prueba.

La repetitividad ha sido evaluada analizando 2 sueros humanos en 24 pocillos de una placa en una prueba única. La reproducibilidad ha sido evaluada analizando estas 2 muestras precitadas en 10 pruebas diferentes.

	Repetitividad		Reproducibilidad	
	Muestras 1	Muestras 2	Muestras 1	Muestras 2
Media (densidad óptica)	0.647	1.518	0.580	1.407
Desviación estándar (absorbance)	0.033	0.058	0.026	0.064
Coefficiente de variación (%)	5.1	3.8	4.5	4.6

Bibliografía:

Müller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. and Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. **36** : 151-160.

Gottstein, B., Jacquier, P., Bresson-Hadni, S. and Eckert, J. (1993) Improved primary immunodiagnosis of alveolar Echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. J. Clin. Microbiol. **31** : 373-376.

Eckert, J., Conraths, F. and Tackmann, K. (2000) Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int. J. Parasitol. **30** : 1283-1294.

Müller, N., Frei, E., Nuñez, S. and Gottstein, B. (2006) Improved serodiagnosis of alveolar echinococcosis of humans using an in vitro-produced *Echinococcus multilocularis* antigen. Parasitology. **134** : 1-10.

Knapp, J., Sako, Y., Grenouillet, F., Bresson-Hadni, S., Richou, C., Gbaguidi-Haore, H., Ito, A., Millon, L. (2014) Comparison of the serological tests ICT and ELISA for the diagnosis of alveolar echinococcosis in France. Parasite. **21**.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

