

ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS recEm-18

Prueba inmunoenzimática para el seguimiento serológico de la equinococosis alveolar humana

96 pruebas inmunoenzimáticas en pocillos individuales destinadas para el uso diagnóstico in vitro y para el uso profesional en el laboratorio

Instructivo de uso para el artículo N° 9310
N° CE: CH-201708-0010



Utilización destinada del producto:

El kit Echinococcus multilocularis ELISA está destinado a la detección cuantitativa de anticuerpos IgG contra el antígeno Em-18 de *Echinococcus multilocularis* en suero humano. Esta prueba está destinada para el seguimiento postoperatorio y/o postoperatorio de pacientes infectados.

Antecedentes:

La equinococosis alveolar está causada por la etapa larvaria de *Echinococcus multilocularis*, una tenia que se encuentra en zorros, coyotes, perros y algunos otros cánidos. Los seres humanos pueden infectarse al ingerir accidentalmente huevos de tenia en alimentos o agua contaminados. Las formas larvales de *E. multilocularis* no maduran completamente en quistes fértiles en los humanos, pero la proliferación continua de vesículas que invaden y destruyen los tejidos circundantes causarán, de forma similar a un tumor, disfunción hepática. El parásito puede diseminarse a otros órganos, como los pulmones y el cerebro. Los principales síntomas son dolor abdominal, astenia, hepatomegalia e ictericia. El diagnóstico se basa en técnicas de imagen, como la TAC, para detectar visualmente las masas parasitarias y las respectivas estructuras similares a quistes difusos. Las pruebas serológicas se utilizan para el cribado de poblaciones en riesgo y para el seguimiento de pacientes con EA después del tratamiento.

Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene todo el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas de adsorción (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos separables de microtitulación sensibilizados con antígeno recombinante Em-18 de *Echinococcus multilocularis*. Los anticuerpos específicos en la muestra se unirán a estos antígenos y el lavado eliminará los anticuerpos inespecíficos. La presencia de anticuerpos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Una segunda etapa de lavado eliminará el conjugado no unido. El revelado de los anticuerpos unidos se realiza mediante la adición de sustrato pNPP que se torna amarillo en presencia de fosfatasa alcalina. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos de *Echinococcus multilocularis* en la muestra. El fosfato potásico se añade para parar la reacción. La densidad óptica a 405 nm se lee con un lector de microplacas ELISA.

La prueba se puede realizar con sistemas automáticos, pero esto debe ser validado por el usuario.

Material que contiene el kit (96 pruebas):

WELL	9310-01	Pocillos sensibilizados con antígenos recombinante Em-18 de <i>Echinococcus multilocularis</i>	96	pocillos	
DILB	9310-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x), de color morado	50	ml	
WASH	9310-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml	
ENZB	9310-04	Tampón de la enzima	50	ml	
STOP	9310-05	Solución de parada (K ₃ PO ₄ 0,5M)	25	ml	
CONTROL	-	9310-06	Suero de control negativo (20 x), tapón verde	200	µl
CONTROL	-/+	9310-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off, 20 x), tapón amarillo	200	µl
CONTROL	+	9310-08	Suero de control positivo (20 x), tapón rojo	200	µl
CONJ	9310-09	Conjugado proteína A - fosfatasa alcalina (50 x), tapón morado	300	µl	
SUBS	9310-10	Sustrato de la fosfatasa (para-nitrofenil-fosfato)	20	tabletas	
		Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml	1	pieza	
		Cuadro para el soporte de los 8 pocillos de ELISA	1	cuadro	

Periodo de validez y conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8°C (transportar a temperatura ambiente), evitar la exposición a largo plazo de los componentes a la luz directa. La fecha de caducidad y el número de lote del kit están impresos en un lado de la caja. Después de la apertura inicial, todos los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad siempre y cuando se almacenen a 2-8°C.

Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas (µl y ml). Recipientes. Tubos de dilución. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a 37°C. Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de 405 nm. Equipo manual o automático para enjuagar los pocillos. Mezclador Vortex. Temporizador.

Preparación de reactivos antes de la utilización:

Ponga todos los reactivos a temperatura ambiente y agítelos antes de usar.

Pocillos sensibilizados: abrir el lado de la bolsa de aluminio 9310-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos (uno para el blanco, tres para los controles más el número de muestras). Poner los pocillos sensibilizados en el soporte de 8 pocillos. Si es necesario, completar las posiciones no utilizadas en el soporte con pocillos ya utilizados. Disponer el/los soporte/s 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 9310-02, 1/10 en agua destilada. Esto se usa para la dilución de los controles, las muestras y el conjugado. El tampón de dilución es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9310-03, 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. La solución de lavado diluida es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Sueros de control: diluir 10 µl de cada suero de control 9310-06 a -08 en 190 µl de tampón de dilución (dilución final: 1/20). Los sueros de control diluidos son estables durante 2 meses a 2-8°C.

Conjugado: diluir el conjugado 9310-09, 1/50 utilizando el tampón de dilución. Diluya el conjugado el día de la prueba. No almacene el conjugado diluido.

Solución de sustrato: disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9310-10 en el tampón de la enzima 9310-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto. Diluya el sustrato el día de la prueba y proteja el tubo de la luz directa. Las tabletas y soluciones de sustrato deben ser incoloras o deben tener solo un ligero matiz amarillo. Si una tableta o una solución de sustrato se vuelve amarilla, es posible que se haya hidrolizado parcialmente y se deba desechar. No almacene la solución de sustrato.

Solución de parada: utilizar el reactivo 9310-05 no diluido.

Recogida y preparación de muestras:

Use suero humano. El suero debe almacenarse a 2-8°C si se analiza en unos pocos días; de lo contrario, consérvelo a -20°C o menor. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras. Agite las muestras en el vórtex y diluya a 1/201 en solución de tampón de dilución (por ejemplo 5 µl de muestra en 1,0 ml).

Precauciones de uso:

Los compuestos tóxicos se encuentran en las siguientes concentraciones:

Componente	Referencia	Acida sódica (Na ₂ N ₃)	Tiomersal
Tampón de dilución (10 x)	9310-02	0,1 %	0,02 %
Solución de lavado (10 x)	9310-03	0,05 %	/
Tampón de la enzima	9310-04	0,01 %	/
Sueros de control (20 x)	9310-06 a -08	0,1 %	0,02 %
Conjugado (50 x)	9310-09	0,1 %	/

En las concentraciones utilizadas, la acida sódica y el tiomersal no presentan ningún riesgo toxicológico en contacto con la piel y las mucosas.

- La solución de parada 9310-05 (0.5 M K₃PO₄) es irritante
- Los sueros de control negativo, cut off y positivo (9310-06 a -08) son sueros de conejo.
- Trate todos los reactivos y las muestras como material potencialmente infeccioso.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes o kits Bordier ELISA.
- No use reactivos de otros fabricantes con reactivos de este kit.
- No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- Cierre los viales de reactivo firmemente después de su uso y no intercambie los tapones de rosca para evitar la contaminación.
- Use puntas de pipetas diferentes y limpias para cada muestra.
- No reutilice los micropocillos.

Consideración relativa a la eliminación

Todos los materiales utilizados para esta prueba generalmente se consideran residuos peligrosos. Consulte las leyes y las reglamentaciones nacionales para la eliminación de residuos peligrosos.

Procedimiento:

Durante el análisis, evite la formación de burbujas en los pocillos.

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 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 suero negativo, débilmente positivo (cut off) y suero positivo respectivamente. Para el análisis de más de 25 muestras, recomendamos llenar los tres últimos pocillos con suero de control como duplicado.

Llenar los otros pocillos con las muestras diluidas (100 µl).

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

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con ~ 250 µl de la solución de lavado.

Etapas 3: Incubación con el conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo (incluido el pocillo blanco, sin suero).

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

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con ~ 250 µl de 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:

Si fuera necesario, limpiar la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente y eliminar las burbujas de aire. Proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm 1 hora después de la adición de la solución de parada.

Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. Cuando corresponda, calcule los valores medios de densidad óptica de los sueros de control duplicados. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen:

- DO del control positivo > 1.200
- DO del control negativo < 5 % del control positivo
- DO del blanco < 0.350

Los controles de calidad de los lotes actuales se encuentran publicados en sitio web: www.bordier.ch.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo 9310-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de equinococosis alveolar y los sueros de sujetos sanos o en remisión. El índice límite de una muestra se define, después de la sustracción del pocillo blanco sin suero, como:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra}}{\text{Densidad óptica del suero cut off}}$$

El resultado es **negativo** cuando el índice del suero a analizar es menor de 1,0. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos Em-18 de *Echinococcus multilocularis* no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando el índice del suero a analizar es mayor de 1,0. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos Em-18 de *Echinococcus multilocularis* es considerado como clínicamente significativo. La disminución o la negativización de los niveles del anticuerpo sérico anti-recEm18 indica una resección quirúrgica completa de la lesión parasitaria o una inactivación del parásito mediante tratamiento farmacológico.

Sensibilidad y especificidad:

Se estudiaron las muestras de suero pre- y posquirúrgico emparejados de 12 pacientes con equinococosis alveolar confirmada y que habían tenido una cirugía radical o no radical. Prequirúrgicamente, 9 pacientes (75%) tenían un índice >1. Entre estos pacientes, 5 tuvieron resultados posquirúrgicos negativos. Pero en los 12 pacientes, los niveles de anticuerpos Em18 posquirúrgicos disminuyeron y fueron significativamente más bajos que en las muestras prequirúrgicas. Se estudiaron las muestras de suero de 25 pacientes con equinococosis alveolar confirmada sin cirugía pero con enfermedad estable con quimioterapia antiparasitaria. 18 (72%) de ellos tenían un índice >1 (índice de mediana 6,3). Se estudiaron muestras de suero de 7 pacientes con equinococosis alveolar confirmada sin cirugía pero con enfermedad progresiva bajo quimioterapia antiparasitaria. 6 (86%) tenían un índice >1 (mediana del índice 13,8).

Interferencias:

La evaluación interna demostró que los sueros hemorrágicos, lipémicos o ictericos no interfieren con los resultados de la prueba.

Precisión:

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)	0.186	1.260	0.157	1.123
Desviación estándar (densidad óptica)	0.022	0.072	0.016	0.074
Coefficiente de variación (%)	11.8	5.7	10.0	6.5

Limitaciones:

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse basándose en los resultados de una única prueba. Un diagnóstico preciso debe tener en cuenta la situación endémica, la historia clínica, la sintomatología, las imágenes y los datos serológicos.

En pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos, los datos serológicos tienen un valor limitado.

Bibliografía:

- Ammann, R.W., Rebber, E.C., Gottstein, B., Grimm, F., Eckert, J., Renner, E.L. (2004) Immunosurveillance of alveolar echinococcosis by specific humoral and cellular immune tests: long-term analysis of the Swiss chemotherapy trial (1976-2001). *J. Hepatol.* **41** : 551-9.
- Tappe, D., Frosch, M., Sako, Y., Itoh, S., Gruner, B., Reuter, S., Nakao, M., Ito, A., Kern, P. (2009) Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80** : 792-7.
- Ishikawa, Y., Sako, Y., Itoh, S., Ohtake, T., Kohgo, Y., Matsuno, T., Ohsaki, Y., Miyokawa, N., Nakao, M., Nakaya, K., Ito, A. (2009) Serological monitoring of progression of alveolar echinococcosis with multiorgan involvement by use of recombinant Em18. *J. Clin. Microbiol.* **47** : 3191-6.
- Tappe, D., Sako, Y., Itoh, S., Frosch, M., Gruner, B., Kern, P., Ito, A. (2010) Immunoglobulin G subclass responses to recombinant Em18 in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stage. *Clin Vaccine Immunol.* **17** : 944-8.
- Ammann, R.W., Stumpe, K.D.M., Grimm, F., Deplazes, P., Huber, S., Bertogg, K., et al. (2015) Outcome after discontinuing long-term benzimidazole treatment in 11 patients with non-resectable alveolar echinococcosis with negative FDG-PET/CT and anti-Em18/3-10 serology. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**.

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

