

# ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de equinococose humana

96 ensaios em poços individuais



Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9350  
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01757

## Utilização prevista:

Diagnóstico serológico (IgG) de doença hidática cística humana (provocada por *Echinococcus granulosus*). Este ensaio também pode ser utilizado para o diagnóstico sorológico de doença hidática alveolar (provocada por *Echinococcus multilocularis*). Os casos positivos e duvidosos devem ser novamente testados com os antígenos Em2-Em18 específicos de *Echinococcus multilocularis* (Bordier Affinity Products, artigo n.º 9300) para identificar a espécie de *Echinococcus* infecciosa.

## Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em poços de microplaca sensibilizados com antígenos de fluido hidático de *Echinococcus granulosus*. A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

## Material incluído no kit (96 ensaios):

<b>WELL</b>	9350-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com Antígeno (fluido hidático) de <i>Echinococcus granulosus</i>	96	poços
<b>DILB</b>	9350-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9350-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9350-04	Tampão da enzima	50	ml
<b>STOP</b>	9350-05	Solução de paragem (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9350-06	Soro de controlo negativo	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9350-07	Soro fracamente positivo (cut off)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9350-08	Soro de controlo positivo	200	µl
<b>CONJ</b>	9350-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina	300	µl
<b>SUBS</b>	9350-10	Substrato de fosfatase	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

## Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

## Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

## Preparação de reagentes antes da sua utilização:

**Poços ELISA:** abrir a parte lateral do saco de alumínio 9350-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

**Tampão de diluição:** diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9350-02, 1/10 em água destilada.

**Solução de lavagem:** diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9350-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

**Soros de controlo** negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10 µl de soros de controlo 9350-06 a -08 em 190 µl de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

**Soros a testar:** diluir 10 µl de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

**Conjugado** de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 9350-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

**Solução de substrato:** pré aquecer o tampão da enzima 9350-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9350-10 em tampão não diluído 9350-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

**Solução de paragem:** utilizar reagente 9350-05 não diluído.



**Advertências e precauções:** as soluções 9350-02, 9350-03, 9350-04 e 9350-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio ( $\text{Na}_3\text{N}$ ). A solução 9350-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 9350-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9350-06 a -08) são de coelhos.

## Volumes a preparar:

			Quantidade total de poços a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Tampão de diluição (10 x)</b>	9350-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Solução de lavagem (10 x)</b>	9350-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Conjugado</b>	9350-09 + tampão de diluição	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Soros de controlo</b>	9350-06 a -08 + tampão de diluição	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Soros a testar</b>	Soro + tampão de diluição	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Solução de substrato</b>	9350-10 + 9350-04	past. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## **Procedimento:**

### **Passo 1: bloqueio:**

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

### **Passo 2: incubação com amostras séricas:**

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 3: incubação com conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 4: incubação com substrato:**

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

### **Passo 5: medição das absorvâncias:**

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

## Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 12 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9350-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de doença hidática cística e soros humanos saudáveis.

O resultado é **negativo** quando a absorvância da amostra analisada é inferior à absorvância do soro fracamente positivo 9350-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra o antígeno ***Echinococcus granulosus*** é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando a absorvância da amostra analisada é superior à absorvância do soro fracamente positivo 9350-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra o antígeno ***Echinococcus granulosus*** é considerada clinicamente significativa.

## Sensibilidade e especificidade do ensaio:

Foi detetada uma sensibilidade de diagnóstico de 96% num grupo de 24 doentes com doença hidática cística (*Echinococcus granulosus*). A maioria dos doentes (90%) com doença hidática cística (*Echinococcus multilocularis*) também apresentou resultado positivo com este ensaio.

Foi testada a especificidade do ensaio com soros de doentes com outras parasitoses. Os resultados foram negativos com 82% dos doentes com helmintíases (n=51) e 83% com protozooses (n=23). 150 soros de dadores de sangue (suíços) foram negativos a 97%. A avaliação interna realizada mostrou que soros hemolisados, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

Dentro do intervalo normal de amostras analisadas num laboratório europeu, o valor preditivo de um resultado negativo é de cerca de 100%. Por outro lado, um resultado positivo deve ser confirmado em todos os casos com ensaios mais específicos (Em2-Em18 e pesquisa de anticorpos anti-8 Kd por immunoblot).

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio. A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média (absorvância)	0,586	1,416	0,684	1,654
Desvio padrão (absorvância)	0,027	0,064	0,024	0,079
Coefficiente de variação (%)	4,6	4,5	3,5	4,8

## Referências:

**Gottstein, B.** (1992) Molecular and Immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin. Microbiol. Rev. **5** : 248-261.

**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<sup>plus</sup> antigen. J. Clin. Microbiol. **31**: 373-376.

**Poretti, D., Felleisen, E., Grimm, F., Pfister, M., Teuscher, F., Zuercher, C., Reichen, J. and Gottstein, B.** (1999) Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. Am. J. Trop. Med. Hyg. **60**: 193-198.

