

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de quiste hidatídico humana

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9350
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01757



Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de quiste hidatídico (Equinococosis por *E. granulosus*) en el ser humano.

El uso de esta prueba puede ser igualmente recomendado para el diagnóstico de la equinococosis alveolar (Equinococosis por *E. multilocularis*). Los casos positivos o dudosos deben ser analizados con los antígenos Em2-Em18 (Artículo N° 9300, Bordier Affinity Products SA) con el fin de identificar la especie.

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 de *Echinococcus granulosus* (líquido hidático). 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	9350-01	Pocillos sensibilizados con antígenos de <i>Echinococcus granulosus</i> (líquido hidático)	96	pocillos
DILB	9350-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
WASH	9350-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
ENZB	9350-04	Tampón de la enzima	50	ml
STOP	9350-05	Solución de parada (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9350-06	Suero de control negativo	200	µl
CONTROL -/+	9350-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	µl
CONTROL +	9350-08	Suero de control positivo	200	µl
CONJ	9350-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	µl
SUBS	9350-10	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 9350-01 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 9350-02, 1/10 en agua destilada.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9350-03, 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 9350-06 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 9350-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

Solución de sustrato: equilibrar el tampón de la enzima 9350-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9350-10 en el tampón de la enzima 9350-04 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 9350-05 no diluido.



Precauciones de uso: Las soluciones 9350-02, 9350-03, 9350-04 y 9350-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio (Na_3N_3). La solución 9350-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9350-05 (0.5 M K_3PO_4) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9350-06 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)	9350-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	9350-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9350-09 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	9350-06 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	9350-10 + 9350-04	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 <12% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo (cut off) 9350-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de quiste hidatídico 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 9350-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos de ***Echinococcus granulosus*** 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 9350-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos de ***Echinococcus granulosus*** es considerado como clínicamente significativo.

Sensibilidad y especificidad de la prueba:

Una sensibilidad diagnóstica de 96% fue observada en un grupo de 24 pacientes que presentaban un quiste hidatídico (*E. granulosus*). La mayor parte de los pacientes (90%) que sufren de equinococosis alveolar (*E. multilocularis*) son también positivos con esta prueba

La especificidad de la reacción en relación a otras parasitosis es de 82% en pacientes que sufren de helmintiasis (toxocariosis, esquistosomiasis, cisticercosis, filariosis, estrongiloidiasis, fascioliasis; n=51) y de 83% en pacientes infectados con protozoarios (amebiasis, leishmaniosis, paludismo; n=23). La especificidad de la reacción en sueros de pacientes donadores de sangre (suizos) es de 97%. (n=150). Un estudio interno ha demostrado que los sueros lipémicos, ictericos o hemolizados no representan un problema para la realización de esta prueba.

En las condiciones de reclutamiento habitual de un laboratorio de análisis en Europa, el valor predictivo negativo es cerca de 100%. Pero un resultado positivo debe ser confirmado en todos los casos con una prueba que posee una especificidad más elevada (Elisa Em2-Em18 (Artículo N° 9300) e inmunoblot de la proteína 8kD).

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)	0.586	1.416	0.684	1.654
Desviación estándar (absorbance)	0.027	0.064	0.024	0.079
Coefficiente de variación (%)	4.6	4.5	3.5	4.8

Bibliografía:

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^{plus} 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.



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

