

ACANTHOCHEILONEMA VITEAE

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de las filariosis humana

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9400
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01755



Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) mediante la detección de anticuerpos dirigidos contra las filariosis humanas linfáticas y africanas (filariosis por *W.bancrofti*, *Brugia sp*, *Loa loa*, *Oncocerca sp*, *Mansonella sp*).
para la confirmación de sospechas clínicas y la vigilancia epidemiológica.

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 somáticos de ***Acanthocheilonema viteae***. 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	9400-01	Pocillos sensibilizados con antígenos somáticos de <i>Acanthocheilonema viteae</i>	96	pocillos
DILB	9400-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
WASH	9400-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
ENZB	9400-04	Tampón de la enzima	50	ml
STOP	9400-05	Solución de parada (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9400-06	Suero de control negativo	200	µl
CONTROL -/+	9400-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	µl
CONTROL +	9400-08	Suero de control positivo	200	µl
CONJ	9400-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	µl
SUBS	9400-10	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 9400-01 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 9400-02, 1/10 en agua destilada.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9400-03, 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 9400-06 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 9400-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

Solución de sustrato: equilibrar el tampón de la enzima 9400-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9400-10 en el tampón de la enzima 9400-04 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 9400-05 no diluido.



Precauciones de uso: Las soluciones 9400-02, 9400-03, 9400-04 y 9400-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio (Na_3N_3). La solución 9400-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9400-05 ($0.5 \text{ M K}_3\text{PO}_4$) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9400-06 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)	9400-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	9400-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9400-09 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	9400-06 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	9400-10 + 9400-04	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) 9400-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de filariosis 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 9400-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos somáticos de *Acanthocheilonema viteae* no tiene una significación clínica. En caso de una sospecha clínica importante, se complementara con la búsqueda de microfilarias, debido a la existencia de fases serológicamente silenciosas en los pacientes microfilarémicos.

El resultado es **positivo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es mayor que la del suero cut off 9400-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos somáticos de *Acanthocheilonema viteae* es considerado como clínicamente significativo. El resultado orienta hacia una infección por filaria; el mismo deberá ser interpretado según el contexto clínico y epidemiológico, tomando en cuenta las reacciones cruzadas citadas a continuación.

Sensibilidad y especificidad de la prueba:

La sensibilidad y la especificidad de esta prueba para las filariosis son respectivamente de 95% y 98%. Esta prueba no diferencia a nivel de la especie las infecciones ocasionadas por las diferentes filarias. Es utilizado como método de despistaje.

Reacciones cruzadas son frecuentemente observadas con los sueros de pacientes afectados por otros helmintos (Ascariasis, triquinosis, estrogiloidiasis, fascioliasis y equinococosis por *E. granulosus*). Como por todo examen serológico parasitario, el resultado deberá ser discutido en función del contexto clínico y epidemiológico.

Esta prueba ha sido evaluada por un laboratorio independiente: de 22 sueros de pacientes positivos para diferentes filarias (presencia de microfilarias y/o serología positiva mediante otras técnicas con un contexto clínico y epidemiológico), 21 sueros fueron positivos con esta prueba. 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)	0.525	1.535	0.764	1.905
Desviación estándar (absorbance)	0.026	0.070	0.068	0.112
Coefficiente de variación (%)	5.0	4.5	8.9	5.9

Bibliografía:

Gueglio, B., Bordier, C. et Marjolet, M. (1995) Mise au point d'un test ELISA pour le diagnostic des filarioses humaines. Bulletin de la société Française de parasitologie. **13** : 67-72.

Laverbratt, C., Ljungström, I., Guzman, G., Thors, C., Eriksson, T. et Akuffo, H. O. (1997) Evaluation of serological assays for diagnosis of onchocercosis. Scand. J. Infect. Dis. **29** : 65 -70.



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

