

FASCIOLA HEPATICA

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la distomatosis humana

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9650
N° CE: CH-201504-0006



Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de la distomatosis humana.

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 recombinantes de *Fasciola hepatica*. 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 | 9650-01 | Pocillos sensibilizados con antígenos recombinantes de <i>Fasciola hepatica</i> | 96 | pocillos |
| DILB | 9650-02 | Tampón de dilución (concentrado 10 x) | 50 | ml |
| WASH | 9650-03 | Solución de lavado (concentrado 10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9650-04 | Tampón de la enzima | 50 | ml |
| STOP | 9650-05 | Solución de parada (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9650-06 | Suero de control negativo | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 9650-07 | Suero de control débilmente positivo (Cut off) | 200 | µl |
| CONTROL + | 9650-08 | Suero de control positivo | 200 | µl |
| CONJ | 9650-09 | Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina | 300 | µl |
| SUBS | 9650-10 | 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 9650-01 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 9650-02, 1/10 en agua destilada.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9650-03, 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 9650-06 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 9650-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

Solución de sustrato: equilibrar el tampón de la enzima 9650-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9650-10 en el tampón de la enzima 9650-04 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 9650-05 no diluido.



Precauciones de uso: Las soluciones 9650-02, 9650-03, 9650-04 y 9650-09 contienen respectivamente 0.1%,0.1%,0.01% et 0.1% de ácido de sodio (Na_3N_3). La solución 9650-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9650-05 (0.5 M K_3PO_4) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9650-06 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) | 9650-02 + H_2O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Sol. de lavado (10 x) | 9650-03 + H_2O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Conjugado | 9650-09 + tampón de dilución | μl + μl | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Sueros de controles | 9650-06 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 | 9650-10 + 9650-04 | tabl. + ml | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 |

Procedimiento:

Etapa 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.

Etapa 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.

Etapa 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.

Etapa 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.

Etapa 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 <8% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo (cut off) 9650-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de distomatosis 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 9650-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos recombinantes de *Fasciola hepatica* 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 9650-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos recombinantes de *Fasciola hepatica* es considerado como clínicamente significativo. El resultado orienta hacia una fascioliasis. El mismo deberá interpretarse teniendo en cuenta los datos de la anamnesis y también de la posibilidad de reacciones cruzadas con parasitosis citadas a continuación

Sensibilidad y especificidad de la prueba:

Se observó una **sensibilidad** del **77%** con 13 sueros de pacientes con fascioliasis.

Se observó una **especificidad** del **99%** con 99 sueros de pacientes donadores de sangre (suizos).

Una **especificidad** del **98%** se observó con sueros de 100 pacientes ingresados en un servicio clínico de enfermedades infecciosas.

Se observó una **especificidad** del **97%** con 30 sueros de pacientes afectados con otras enfermedades parasitarias. Filariasis (0/12), hidatidosis (0/5), esquistosomiasis (0/1) y equinococosis alveolar (1/12).

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) | 0.459 | 1.491 | 0.469 | 1.547 |
| Desviación estándar (absorbance) | 0.023 | 0.089 | 0.028 | 0.069 |
| Coefficiente de variación (%) | 5.0 | 6.0 | 5.9 | 4.5 |

Bibliografía:

Figuroa-Santiago, O., Delgado, B. and Espino, A.M. (2011) Fasciola hepatica saposin-like protein-2-based ELISA for the serodiagnosis of chronic human fascioliasis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70, 355-361.

Gottstein B, Schneeberger M, Boubaker G, Merkle B, Huber C, et al. (2014) Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from Fasciola hepatica for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis. PLoS Negl Trop Dis 8(6): e2860. doi:10.1371/journal.pntd.0002860



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

