

Anisakidae IgG ELISA

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la anisakidosis digestiva humana

96 ensayos 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° 9800

UDI-DI: 07640158219805



Utilización destinada del producto:

El kit Bordier *Anisakidae* IgG ELISA está destinado a la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra los parásitos de la familia de *Anisakidae* en suero humano. La serología constituye una ayuda para el diagnóstico y no se puede utilizar como el único método de diagnóstico.

Antecedentes:

La anisakidosis es una zoonosis helmíntica mundial causada por nematodos de peces marinos de la familia *Anisakidae*. En humanos, la infección se puede producir por la ingestión de pescados crudos o no suficientemente cocinados. Los gusanos adultos de los nematodos anisákidos residen en el tracto digestivo de mamíferos marinos (anfitriones finales). Tras embrionar en el agua, los huevos liberan larvas L3 infectantes al agua, para luego ser ingeridos por crustáceos planctónicos (anfitriones intermedios). Tras su consumo por parte de peces o cefalópodos (anfitriones paraténicos), las larvas migran a las vísceras y a la cavidad peritoneal, por lo que no siguen evolucionando. Tras su ingestión por parte de mamíferos marinos, las larvas se desarrollan hasta convertirse en gusanos adultos. El ser humano, anfitrión accidental, supone el fin de proceso de desarrollo parasitario. La mayoría de las personas infectadas no presenta síntomas. No obstante, en casos aislados, pueden aparecer síntomas en las fases gástrica (dolor epigástrico, náuseas y vómitos), intestinal (dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea) o alérgica (urticaria, prurito, angioedema y broncoespasmo). El diagnóstico se basa en el estudio de los signos y síntomas sumados a los antecedentes de exposición y en un resultado positivo en los análisis serológicos.

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 antígenos excretados/segregados (E/S) de larvas de *Anisakidae*. 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 *Anisakidae* 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 es manual pero puede realizar con sistemas automáticos, los cuales deben ser validados por el usuario.

Material que contiene el kit (96 pruebas):

WELL	9800-01	Pocillos sensibilizados con antígenos E/S de <i>Anisakidae</i>	96	pocillos
DILB	9800-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x), de color morado	50	ml
WASH	9800-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
ENZB	9800-04	Tampón de la enzima	50	ml
STOP	9800-05	Solución de parada (K_3PO_4 0,5M)	25	ml
CONTROL -	9800-06	Suero de control negativo (20 x), tapón verde	200	μ l
CONTROL +/-	9800-07	Suero de control positivo débil (Cut off, 20 x), tapón amarillo	200	μ l
CONTROL +	9800-08	Suero de control positivo (20 x), tapón rojo	200	μ l
CONJ	9800-09	Conjugado proteína A - fosfatasa alcalina (50 x), tapón morado	300	μ l
SUBS	9800-10	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°C y +8°C (transporte validado entre -20°C y +37°C durante 21 días), 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 entre +2°C y +8°C.

Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas (μ l 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 entre +20°C y +30°C durante al menos 1 hora y agítelos antes de usar.

Pocillos sensibilizados: abrir el lado de la bolsa de aluminio 9800-01 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 9800-02, 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 entre +2°C y +8°C.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9800-03, 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 entre +2°C y +8°C.

Sueros de control: diluir 10 µl de cada suero de control 9800-06 a -08 en 190 µl de tampón de dilución (dilución final: 1/20). Los sueros de control diluidos son estables durante 2 meses entre +2°C y +8°C.

Conjugado: diluir el conjugado 9800-09, 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 9800-10 en el tampón de la enzima 9800-04 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 9800-05 no diluido.

Recogida y preparación de muestras:

Use suero humano. Conservar entre +2°C y +8°C si se analiza en un plazo de 7 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 5µl de muestra en 1,0 ml). No almacene muestras diluidas.

Precauciones de uso:

Los compuestos tóxicos se encuentran en las siguientes concentraciones:

Componente	Referencia	Acida sódica (NaN ₃)	Tiomersal
Tampón de dilución (10 x)	9800-02	0,1%	0,02%
Solución de lavado (10 x)	9800-03	0,05%	/
Tampón de la enzima	9800-04	0,01%	/
Sueros de control (20 x)	9800-06 a -08	0,1%	0,02%
Conjugado (50 x)	9800-09	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.

Componente	Componente peligroso	Pictograma de peligro	Declaración de peligro	Declaración de precaución
Solución de parada	fosfato potásico, tribásico		Provoca lesiones oculares graves	Llevar protección ocular. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si están presentes y es fácil hacerlo. Continuar enjuagando

- Los sueros de control negativo, cut off y positivo (9800-06 a -08) son de origen animal (conejos) y deben manipularse con cuidado.
- 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 pocillos.
- Evite el deterioro de los pocillos por acción mecánica (puntas/conos, boquillas).

- Las descripciones de los símbolos utilizados en las etiquetas pueden consultarse en el sitio web www.bordier.ch.

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.

Etapla 1: Preincubación:

Llenar los pocillos con 250 µl de solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos entre +20°C y +30°C.

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

Etapla 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.

Etapla 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.

Etapla 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.

Etapla 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:

- Absorbancia (A) del control positivo > 1,200
- A del control positivo débil > 9% de A del control positivo
- A del control negativo < 8% de A del control positivo
- A de blanco sin suero < 0,350

En caso de que la señal de la muestra supere el rango de medición del lector de microplacas, se deberá atribuir el valor correspondiente al rango de medición superior del lector.

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 9800-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de anisakidosis y los sueros de sujetos sanos. 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 de **Anisakidae** no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando el índice del suero a analizar es mayor o igual de **1,0**. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos de **Anisakidae** es considerado como clínicamente significativo. Indica que el paciente ha estado en contacto con el parásito. Cada laboratorio podría definir una zona gris en función de su población de pacientes. En caso de resultados ambiguos o dudosos, recomendamos repetir la prueba 2-4 semanas después con una muestra fresca.

En caso de resultado positivo o dudoso, se recomienda llevar a cabo una prueba de confirmación (por lo general, mediante la técnica Western blot), si dicha prueba está disponible o si así lo exige la reglamentación nacional.

Desempeño analítico:

Especificidad analítica:

Se observó una especificidad del 81% con 47 sueros de pacientes que padecían otras infecciones parasitarias. La reactividad cruzada tiene lugar principalmente en pacientes con toxocariosis, filariasis y estrongiloidosis.

No se observó interferencia positiva o negativa con concentraciones suprafisiológicas de hemoglobina, lípidos o bilirrubina en sueros suplementados con interferentes.

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 duplicadas en 10 pruebas diferentes.

	Repetitividad		Reproducibilidad	
	Muestras 1	Muestras 2	Muestras 1	Muestras 2
Media (densidad óptica)	0,108	1,584	0,121	1,754
Desviación estándar (densidad óptica)	0,008	0,082	0,020	0,111
Coefficiente de variación (%)	7,4	5,2	16,7	6,3

Actuaciones clínicas:

Sensibilidad diagnóstica:

Se observó una sensibilidad del 97% con 38 sueros de pacientes que padecían anisakidosis digestiva o alérgica.

Especificidad diagnóstica:

Se observó una especificidad del 97% con 180 sueros de donantes de sangre (suizos). Se observó una especificidad del 96% con 98 sueros de pacientes de una unidad de infectología (Suiza). Se observó una especificidad del 86% con 43 sueros de pacientes bajo sospecha de anisakidosis, pero en los que esta enfermedad se había descartado con certeza.

Valor predictivo positivo y negativo:

En las poblaciones mencionadas con anterioridad, se observó un VPP del 77% y un VPN del 99%.

Valores esperados en poblaciones normales y afectadas:

En una población normal de 180 donantes de sangre suizos y 98 sueros de una unidad de infectología suiza, el valor de índice esperado es de 0,34. En una población afectada de 47 sueros de pacientes que padecían anisakidosis, el valor de índice esperado es de 3,71.

Incidencias:

Cualquier incidencia grave que se produzca en relación con el dispositivo deberá ponerse en conocimiento del fabricante y de la autoridad competente del Estado miembro donde se encuentren el usuario y/o el paciente.

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:

Mazzucco, M., Raia, D.D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F. and Casuccio, A. (2018) Validation of an *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. Plos one 13.

Kochanowski, M., Gonzalez-Munoz, M., Gomez-Morales, M.A., Gottstein, B., Dabrowska, J., Rozycki, M., Cencek, T., Muller, N. and Boubaker, G. (2019) Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG ELISA. Experimental Parasitology 197, 9-15.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

