

CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA

Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG anti *Echinococcus granulosus*

Solamente Para uso diagnóstico *in vitro*. Inmunodiagnóstico para la detección cualitativa de anticuerpos IgG dirigidos contra *Echinococcus granulosus* en muestras de suero o plasma humano.

I) SIGNIFICADO CLINICO

La hidatidosis humana es una zoonosis parasitaria causada por el estadio larvario del cestodo *E. granulosus* (familia Taeniidae). Es una enfermedad parasitaria donde el hombre es el huésped intermediario, por lo que el parásito desarrolla formas quísticas en él. La enfermedad tiene una distribución mundial, con elevadas prevalencias en los países del área mediterránea, norte y este de África, China, Sudamérica y Australia^{1,2}.

El líquido hidático (LH) está constituido por una compleja mezcla de glicoproteínas y lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales. Algunos de sus componentes provienen del huésped (principalmente albúmina e inmunoglobulinas), mientras que el resto son producto de la actividad metabólica del metacestodo. Históricamente, el LH es la fuente de antígenos más importante para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. Los inmunoensayos enzimáticos preparados a partir de LH poseen una sensibilidad en torno al 85-95%, aunque su especificidad está frecuentemente limitada por problemas de reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados con otros cestodos, nematodos y trematodos^{3,4,5}, especialmente con *E. multilocularis* y *T. solium*. Por estos motivos el serodiagnóstico basado en el uso de LH presenta inconvenientes en regiones del mundo donde estas enfermedades son endémicas. Otro factor que hay que considerar es el tipo de órgano afectado, puesto que la localización del quiste puede ser una importante causa de falsos negativos. Así, entre el 10-20% de los pacientes con quistes hepáticos y aproximadamente el 40% de los pacientes con quistes pulmonares no presentan niveles significativos de anticuerpos (IgG) específicos^{6,7}. Del mismo modo, quistes alojados en riñón, bazo, cerebro o hueso inducen una baja o nula respuesta de anticuerpos contra el parásito⁷.

II) FUNDAMENTOS DEL ENSAYO

CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la detección cualitativa de anticuerpos contra el *E. granulosus*. Se realiza en placas cuyos pocillos son sensibilizados con un antígeno purificado a partir de líquido hidático. Si las muestras analizadas contienen anticuerpos específicos para *E. granulosus* estos formarán un complejo estable con los antígenos que recubren los pocillos. El material unido de forma no específica será eliminado por medio del lavado. Durante la incubación con el conjugado, los anticuerpos anti-IgG humana marcados con peroxidasa, se unirán al complejo formado. Finalmente en la etapa de incubación con el sustrato cromogénico, la peroxidasa unida al complejo producirá una coloración, que permitirá detectar las muestras reactivas al *E. granulosus*. La reacción enzimática será detenida por la adición de ácido sulfúrico, midiéndose enseguida la intensidad de color con un lector colorimétrico para placas de ELISA.

- COMPONENTES

Componentes de CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA para 96 determinaciones.

- Una placa de ELISA para 96 determinaciones, sensibilizada con antígeno purificado a partir de líquido hidático. Cada placa está compuesta por 12 tiras de 8 pocillos que pueden ser utilizadas individualmente y es proporcionada dentro de un embalaje herméticamente cerrado, que contiene un desecante en su interior.
- Sello autoadhesivos para cubrir los pocillos
- Bolsa autosellante.
- Las soluciones que componen el kit son detalladas en la tabla 1.

Tabla 1

Solución	Descripción
Solución de lavado (concentrado 25x)	Frasco con 60ml de solución tampón, pH 7.2. Contiene Tween 20.
Diluyente de muestras	Frasco con 30ml de solución tampón, pH 7.2. Contiene Tween 20, BSA y aditivos
Conjugado anti-IgG	Frasco con 15ml de solución de conjugado Anti-IgG (cabra) marcado con peroxidasa en buffer Tris y estabilizantes.
Sustrato	Frasco con 15ml de Tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. Es un reactivo muy sensible a la luz y no debe ser utilizado si presenta un aspecto turbio o color azul.
Control positivo alto	Frasco con 200 µl de suero humano positivo para Hidatidosis. Contiene Azida de Sodio
Control negativo	Frasco con 200 µl de suero humano negativo para Hidatidosis. Contiene Azida de Sodio
Solución de frenado	Frasco con 10ml de solución de Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 2N. En caso de contacto con piel o mucosas, lave la zona afectada con abundante agua.

III) MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS EN EL KIT

- Micropipetas o pipetas multicanal
- Punteros descartables para micropipetas
- Agua destilada o desionizada
- Sistema de lavado automático de microplacas (opcional)
- Lector de microplacas con filtro para 450 nm y filtro de referencia (620 o 630 nm) opcional
- Estufa con temperatura regulable de 37° C.

IV) PRECAUCIONES DE USO

- Utilizar solamente para diagnóstico "in vitro"
- Los sueros humanos utilizados como controles mostraron resultados negativos para Chagas, HTLV, Sífilis, HIV, HBV y para HCV. De todas formas se recomienda manipularlos con las precauciones de muestras potencialmente infecciosas. Ningún método conocido actualmente garantiza la ausencia de agentes infecciosos en derivados sanguíneos.
- Todos los reactivos y componentes deben estar a temperatura ambiente en el momento de ser usados y deben ser refrigerados a 2-8 grados centígrados inmediatamente después de su uso.
- No abra el sobre que contiene la placa hasta que esta no haya alcanzado la temperatura ambiente. Guarde las tiras no utilizadas junto con el desecante, dentro de la bolsa plástica provista a tales efectos. Asegúrese de que la bolsa quede bien cerrada.
- Los recipientes utilizados para la preparación de los reactivos deben estar limpios y libres de detergentes o cloro.
- Use punteros nuevos para cada muestra y reactivo.
- Evite tocar las paredes del pocillo con el puntero de la pipeta.
- Nunca pipetee directamente del frasco original. Coloque en otro recipiente el volumen que va a utilizar.
- Nunca devuelva restos de reactivos no utilizados a los frascos originales.
- No mezcle reactivos provenientes de diferentes lotes.
- Siempre considere que la reproducción de resultados depende de la precisión del pipeteado, de la exactitud de los tiempos y temperaturas de incubación y del correcto lavado de los pocillos.
- No utilice objetos metálicos que puedan entrar en contacto con las soluciones.
- No utilice muestras o reactivos contaminados porque pueden producir falsos resultados.

V) PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Use guantes cuando manipule muestras y reactivos.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba, fume o manipule lentes de contacto en el área de trabajo.
- Limpie y desinfecte cualquier derrame de muestras o reactivos utilizando algún desinfectante tal como hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Evite el contacto de la solución de frenado con piel y mucosas. Si éste u otro reactivo entra en contacto con piel o mucosas, lave el área afectada con abundante agua.
- Elimine todo el material contaminado en recipientes adecuados para desechos biológicos. Éstos pueden ser decontaminados en autoclave a 121° C por una hora o tratados con hipoclorito de sodio por dos horas.
- Los restos de muestras, controles y reactivos utilizados deben ser tratados con hipoclorito de sodio al 0,5% por dos horas antes de ser eliminados.

VI) CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

- CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA debe ser almacenado y transportado a una temperatura de entre 2 y 8° C. **No debe ser congelado.**
- Los estudios de estabilidad demuestran que CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA conserva su actividad inicial después de dos semanas a 37° C. Sin embargo, se recomienda respetar las condiciones de almacenamiento descritas.

VII) PREPARACION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- CELQUEST HIDATIDOSIS ELISA puede ser utilizado con muestras de suero o plasma humano.
- Los anticoagulantes presentes en las muestras como EDTA, oxalato, heparina o citrato, no afectan los resultados del ensayo.
- Las muestras que contienen precipitados o coágulos deben ser centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos antes del análisis. **Advertencia:** no utilizar muestras con contaminación microbiana pues pueden producir falsos resultados. Las muestras pueden ser conservadas entre 2 y 8° C hasta una semana antes de ser analizadas. Para períodos más prolongados se puede agregar azida de sodio al 0.1% y congelarlas a -20 grados centígrados o temperaturas más bajas. No someta las muestras a ciclos repetitivos de congelamiento-descongelamiento, ya que esto afecta su estabilidad. **Advertencia:** no congele las muestras en congeladores con deshielo automático. Si utiliza muestras congeladas éstas deberán ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

VIII) PROCEDIMIENTO

Antes de comenzar el ensayo aguarde que los reactivos alcancen temperatura ambiente.

1- Diluir la solución de lavado que se presenta concentrado 25 veces (25x) con agua destilada. Por ejemplo, para preparar 500 mL, medir 20 mL de solución de lavado y adicionarle 480 mL de agua. Si la solución 25X presenta cristales, éstos deben disolverse por agitación constante previo al uso de la solución.

2- Colocar 100 mL de diluyente de muestras en cada uno de los pocillos que serán utilizados. Incluir dos pocillos para el blanco de reacción, dos para el control positivo y dos para el control negativo.

3- Adicionar 5mL de suero o plasma a cada pocillo, control positivo y negativo

4- Sellar la placa con el sello autoadhesivo proporcionado con el kit para impedir la evaporación de los reactivos. Incubar por 30 minutos a 37° C +/- 1.

5- Lavar la placa con la solución de lavado diluida (1x) con aproximadamente 350 mL por pocillo. Dejar la solución de lavado aprox. 30 seg cada vez. Eliminar la solución después de cada lavado. Se recomienda lavar 5 veces con el equipo de lavado automático o lavado manual.

Protocolo recomendado para lavado automático de tiras:

Realice 5 ciclos de lavado dispensando 350 µL de la solución de lavado diluida. Asegúrese de que:

- a) la solución de lavado llene el pocillo.
- b) la solución de lavado no se derrame del pocillo.
- c) el tiempo de permanencia sea de 30 seg.
- d) no quede líquido remanente en el pocillo al finalizar los lavados.
- e) el lavador No toque el fondo de los pocillos. Esto podría afectar la reacción.

Nota: Mantenga siempre el equipamiento limpio enjuagando con abundante agua destilada al final de cada jornada de trabajo. Realice un mantenimiento periódico de acuerdo a las instrucciones del proveedor. SIEMPRE VERIFIQUE QUE EL EQUIPO NO TOQUE EL FONDO DE LOS POCILLOS YA QUE SE PUEDE AFECTAR LA REACCIÓN.

6- Después del último lavado colocar la placa invertida sobre un papel absorbente y golpearla suavemente sobre dicha superficie. **No permitir que la placa se seque.**

7- Adicionar 100mL de conjugado en todos los pocillos.

8- Sellar la placa e incubar 15 minutos a 37° C +/- 1.

Lavar la placa con la solución de lavado de la misma manera que en los pasos 5 y 6.

9- Revelado: adicionar 100 mL de sustrato a cada pocillo. Incubar la placa **exactamente por 30 minutos** a temperatura ambiente.

10- Interrumpir la reacción adicionando 50 mL de ácido sulfúrico en cada pocillo.

11- Medir densidad óptica a 450nm o bicromática a 450-620 a 650

IX)

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Lea la placa en el tiempo más breve posible.

Advertencia: lecturas posteriores a los 60 minutos no son confiables.

Corregir todos los valores restando el promedio de los blancos de reacción

Control de Calidad

Los resultados de un ensayo son válidos si se cumplen los siguientes criterios:

1. Absorbancia promedio de los blancos debe ser menor de 0,15
2. Control negativo: absorbancia menor que 0,20 después de restar el blanco.
3. Control positivo: absorbancia igual o mayor que 1,0.

Resultados

1. Calcular el valor umbral (Cut off) según: $(CP+CN) \times 0,19 = \text{Cut off}$

2. Dividir la absorbancia de la muestra por el valor umbral.

Positivo: relación absorbancia/valor umbral $\geq 1,1$

Negativo: relación absorbancia/valor umbral $< 0,9$

Dudoso: relación absorbancia/valor umbral $\geq 0,9 < 1,1$

Interpretación de los Resultados

Una reacción positiva debe interpretarse como la presencia de anticuerpos IgG anti- *E. granulosus*.

Una reacción negativa indica que el paciente no tiene niveles detectables de anticuerpos anti-*E. granulosus*. Esto puede deberse a la ausencia de infección o a una débil respuesta inmune del paciente.

Si el resultado de la muestra es dudoso, repetir el ensayo por duplicado. Si la lectura persiste en esta zona considérela como un suero positivo.

X)

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Todas las muestras indeterminadas o positivas deben ser repetidas en duplicado. Las muestras repetidamente reactivas pueden ser confirmadas por técnicas tales como: Western Blot o PCR.
- El diagnóstico de la hidatidosis debe basarse en una combinación de resultados que incluyen la historia clínica, técnicas imagenológicas y los ensayos serológicos posteriores como Western Blot.
- Las muestras con contaminación microbiana o de personas con otras parasitosis o enfermedades autoinmunes pueden producir falsos resultados.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección con *E. granulosus*. Una respuesta inmune humoral no es detectada durante las primeras semanas después de la infección por ningún método existente en el mercado.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McManus DP, Zhang W, Li J, Rishi AK. Echinococcosis. Lancet. 2003;362:1295-304.
2. Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. Parasitol Int. 2006;55:S187-S91.
3. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. Clin Microbiol Rev. 2004;17: 107-35
4. Leggett GR, Yang W, McManus DP. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in Echinococcus granulosus cyst fluid by immunoblot analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1992;86:189-92.
5. Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, et al. Modulation of human immune response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun. 2001;69:288-96.
6. Orduña A, Zarzosa P, Abad R, Bratos MA, Sainz M, Gutiérrez P, et al. Influence of factors related to cysts in the sensitivity of six serological tests for diagnosis of human hydatid disease. Arch Int Hidatid. 1997;32:280-6.
7. Ammann RW, Eckert J. Cestodes: Echinococcus. Gastroenterol Clin North Am. 1996;25:655-89.



Consultar las
instrucciones de
uso



Atención
Consulte las
Instrucciones de
uso



Dispositivo
médico para
diagnóstico in
vitro



Límite de
temperatura



Fabricante