

RIDASCREEN[®] Taenia solium IgG

Art. n°: K7721



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 6151 8102-0 / Fax: +49 6151 8102-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El RIDASCREEN® Taenia solium IgG es un test de enzimoimmunoensayo (EIA) para la identificación cualitativa de anticuerpos IgG contra Taenia solium y sus hidátides (cisticercos) en el suero humano. El test debe realizarse cuando existan sospechas fundadas de una infección con Taenia solium o para esclarecer el estatus del sistema inmune.

2. Resumen y explicación del test

Después de una infección con Taenia solium el sistema inmune reacciona con la producción de anticuerpos específicos contra el agente patógeno. Estos agentes se pueden detectar en el suero con ayuda de procedimientos inmunológicos. Para el valor informativo del test es importante, además de la selección del antígeno específico contra el agente patógeno, también el método de análisis empleado. El enzimoimmunoensayo se caracteriza, en comparación con otros métodos serológicos (por ej. KBR), porque frecuentemente presenta una mejor sensibilidad y especificidad.

3. Fundamento del test

Los antígenos purificados se encuentran unidos a la microplaca de titulación. Los anticuerpos presentes en muestras de suero de los pacientes se enlazan a los antígenos y son detectados en un segundo paso mediante una proteína A marcada con una enzima (conjugado). La enzima convierte el sustrato incoloro (peróxido de urea/TMB) en un producto final azul. La reacción enzimática se termina mediante la adición de ácido sulfúrico. Así ocurre también de forma simultánea un cambio de color del azul al amarillo. Acto seguido se realiza la determinación en un fotómetro a 450 nm (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm).

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 96 determinaciones.

Plate	96	Microplaca de titulación, 12 tiras de microtitulación (separables) en determ.	Microplaca de titulación, 12 tiras de microtitulación (separables) en marco de soporte; recubiertas con antígeno de <i>Taenia solium</i>
Diluent <i>tapa incolora</i>	100 ml	Buffer de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato, lista para el uso; teñida de amarillo, contiene Kathon CG al 0,1% y Tween 20 al 0,1 %	Buffer de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato, lista para el uso; teñida de amarillo, contiene Kathon CG al 0,1% y Tween 20 al 0,1 %
Wash <i>tapa marrón</i>	50 ml	Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato, (conc. 20 veces); teñida de azul, contiene Kathon CG al 0,5 % y Tween 20 al 1,5 %	Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato, (conc. 20 veces); teñida de azul, contiene Kathon CG al 0,5 % y Tween 20 al 1,5 %
Control + <i>tapa roja</i>	1,2 ml	Control positivo IgG, Suero humano, listo para el uso; contiene Kathon CG al 0,1 %	Control positivo IgG, Suero humano, listo para el uso; contiene Kathon CG al 0,1 %
Control - <i>tapa incolora</i>	2,5 ml	Control positivo IgG, Suero humano, listo para el uso; contiene Kathon CG al 0,1 % y Tween 20 al 0,1 %	Control positivo IgG, Suero humano, listo para el uso; contiene Kathon CG al 0,1 % y Tween 20 al 0,1 %
Conjugate <i>tapa anaranjada</i>	12 ml	Conjugado de proteína A; listo para el uso; proteína A conjugada con peroxidasa en solución de proteína estabilizada, contiene Metilisotiazolona al 0,01 %, Bromonitrodioxano al 0,01 %, y 10 ppm de Proclin	Conjugado de proteína A; listo para el uso; proteína A conjugada con peroxidasa en solución de proteína estabilizada, contiene Metilisotiazolona al 0,01 %, Bromonitrodioxano al 0,01 %, y 10 ppm de Proclin
Substrate <i>tapa verde</i>	6 ml	Sustrato, listo para el uso; Peróxido de hidrógeno	Sustrato, listo para el uso; Peróxido de hidrógeno
Chromogen <i>tapa azul</i>	6 ml	Cromógeno, listo para el uso; Tetrametilbenzidina (TMB)	Cromógeno, listo para el uso; Tetrametilbenzidina (TMB)
Stop <i>tapa amarilla</i>	6 ml	Reactivo de parada, listo para el uso; 1 N de ácido sulfúrico,	Reactivo de parada, listo para el uso; 1 N de ácido sulfúrico,

5. Reactivos y su almacenamiento

Este Kit, almacenado a una temperatura entre 2° y 8 °C, puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene a 2 – 8 °C, o cinco días a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de la fecha de caducidad no se asume ninguna garantía de calidad.

La bolsa de aluminio donde viene la microplaca se debe abrir de manera que el cierre a presión no sea eliminado. Las tiras de microtitulación no usadas se deben guardar en la bolsa de aluminio cerrada.

Se debe evitar la contaminación de los reactivos al igual que la incidencia directa de luz sobre el cromógeno incoloro.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de muestra
- Agitador Vortex
- Micropipetas para volúmenes de 10 – 100 µl y 100 – 1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Instrumento de lavado para las microplacas de titulación o pipeta multicanal
- Fotómetro para microplacas de titulación (450 nm, filtro de referencia ≥ 620 nm)
- Papel de filtro (paños de laboratorio)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

Los sueros de control del kit (controles positivo y negativo) fueron verificados y no contienen anticuerpos VIH ni HCV así como tampoco HBSAg. No obstante Ud. debe considerarlos, al igual que las muestras de pacientes y otros materiales con los cuales entre en contacto, como potencialmente infecciosos y manejarlos en correspondencia con las regulaciones de seguridad nacionales.

El control estándar y el control negativo, así como el buffer de muestras y de lavado contienen Kathon CG como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El peróxido de urea puede conducir a efectos cáusticos sobre la piel. ¡Manejar con cuidado!

El reactivo de parada contiene una solución 1 N de ácido sulfúrico ¡Evitar el contacto con la piel o ropa! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C. ATENCIÓN: Para evitar la formación de gases venenosos deben neutralizarse los residuos líquidos que contengan reactivo de parada antes de echarlos a la solución de hipoclorito.

8. Recolección y conservación de las muestras

El test fue desarrollado para el examen de muestras de suero humano. Después de la extracción de sangre se debe separar el suero lo antes posible de los coágulos para evitar la hemólisis. Las muestras se deben guardar en frío o congeladas hasta que se realice el test. Evite por todos los medios congelar y descongelar el suero varias veces, así como su contaminación microbiana. El empleo de muestras inactivadas por el calor, lipémicas, hemolíticas, ictericas o turbias puede conducir a resultados falsos.

Tabla 1: Conservación de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su uso se deben llevar todos los reactivos y las tiras de microtitulación a la temperatura ambiente (20 – 25 °C). Las tiras de microtitulación no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no hayan alcanzado la temperatura del ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Después de su uso se debe conservar inmediatamente el kit de prueba a la misma temperatura de 2 – 8 °C.

Se debe extraer solamente tanta cantidad de reactivo como sea necesaria para la realización del test. Las cantidades sobrantes de reactivo no se deben retornar a los frascos, ya que esto puede provocar una contaminación.

Las tiras de microtitulación sólo pueden ser utilizadas una vez. Los reactivos y las tiras de microtitulación no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad.

El buffer de lavado y el de las muestras, así como el sustrato/cromógeno no son específicos del test; y pueden ser por tanto empleados también en los demás tests RIDASCREEN® EIA para la identificación de anticuerpos contra parásitos.

9.2. Preparación del buffer de lavado

Se mezcla 1 parte del buffer de lavado concentrado **Wash** con 19 partes de agua destilada. Con este fin se transfieren 50 ml del concentrado a una probeta de 1000 ml y se completa con agua destilada a 1000 ml. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C). El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene a 2 – 8 °C, o cinco días a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.3. Preparación de las muestras

Las muestras de suero que se analizarán se diluyen 1:50 con el buffer de muestras **Diluent** antes de comenzar el test.

por ej. 10 µl Suero + 490 µl **Diluent**

¡Atención!

Los controles positivo y negativo están listos para el uso y no deben ser diluidos.

9.4. Primera incubación

Después de introducir suficiente cantidad de cavidades en el marco de la microplaca se pipetea respectivamente 100 µl de los sueros diluidos y de los controles **Control -** y **Control +** a los pocillos correspondientes y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Se recomienda realizar una determinación por duplicado del control negativo **Control -**.

9.5. Lavar

Las cavidades se deben vaciar a un recipiente de desechos con hipoclorito para la desinfección. Posteriormente se sacude la placa sobre un papel absorbente para eliminar los restos de humedad. Seguidamente se lava 5 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso. Después de cada enjuague se cuida de vaciar completamente la placa sacudiéndola sobre partes secas y no usadas del papel.

Cuando se usen lavadores automáticos se debe poner atención al ajuste correcto del instrumento al tipo de microplaca utilizado. Después del último lavado se debe sacudir la placa cuidadosamente sobre papel absorbente limpio o paños de laboratorio para eliminar la humedad residual.

9.6. Segunda incubación

Adición de 100 µl (ó 2 gotas) de conjugado **Conjugate** a cada uno de los pocillos. A continuación se incuba la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavar

Lavar 5 veces según el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Transferir a cada cavidad 50 µl (ó 1 gota) de sustrato **Substrate** e igualmente de cromógeno **Chromogen**. A continuación se incuba la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después se adicionan 50 µl (ó 1 gota) de reactivo de parada **Stop** en cada una de las cavidades para detener la reacción. Se mezcla cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se mide la absorbancia a 450 nm en un fotómetro lector de placas (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm). La compensación del valor cero se hace contra aire.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

Como control de calidad se debe realizar en cada test un control positivo y un control negativo (en determinación doble). El test ha transcurrido correctamente si el valor promedio de la absorbancia del control negativo a 450 nm es menor que 0,3. Si los valores de las dos mediciones individuales difieren del valor promedio en más de 25%, se requiere repetir el test. El valor de absorbancia del control positivo a 450 nm tiene que ser mayor de 0,8.

Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez o coloración azul del cromógeno incoloro antes de ser transferidos a las cavidades, puede ser un indicio del vencimiento de los reactivos.

Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de cromógeno azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del Índice de las Muestras

1. El valor promedio de la absorbancia del control negativo se calcula.
2. Al valor promedio de la absorbancia se le suma 0,150. Como resultado se obtiene el cut-off del test.
3. Dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra por el valor cut-off se obtiene el Índice de las Muestras.

por ej.: Control negativo 1 D.O. = 0,115
Control negativo 2 D.O. = 0,125
Muestra D.O. = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150 = 0,270$$

$$\text{Índice de las Muestras} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

11.2. Resultado del test

Tabla 2: Evaluación del Índice de las Muestras

	negativo	valores límite	positivo
Índice de las Muestras	< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

12. Limitaciones del método

El RIDASCREEN® Taenia solium IgG EIA detecta anticuerpos IgG contra Taenia solium y sus hidátides. Se debe realizar cuando exista sospecha fundada de una infección con Taenia solium. Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico y las demás conclusiones diagnósticas.

Las señales de anticuerpos son dependientes de la localización del ataque parasitario y pueden variar de un paciente a otro.

Un resultado negativo no excluye una infección. En un punto prematuro de la infección puede que el contenido de anticuerpo sea tan bajo, que el test dé por resultado valores negativos o límite. Si anamnesticamente existe sospecha fundada de infección, se debe realizar el test nuevamente después de dos a tres semanas con otra muestra de suero.

Se han reportado reacciones cruzadas con anticuerpos contra Equinococos.

Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes infecciosos.

13. Características de rendimiento

Tabla 3: Varianza inter-ensayos (n=5)

<u>Varianza inter-ensayos</u>	<u>IgG</u>	
	DO	Coefficiente de variabilidad
Suero 1	0,282	21,3%
Suero 2	0,564	7,8%
Suero 3	1,264	10,1%

Tabla 4: Varianza intra-ensayos (n=24)

<u>Varianza intra-ensayos</u>	<u>IgG</u>	
	DO	Coefficiente de variabilidad
Suero 1	0,253	9,0%
Suero 2	0,496	7,7%
Suero 3	1,036	7,3%

Tabla 5: Sensibilidad y especificidad en comparación con otros dos ELISA comerciales

	IgG
Sensibilidad	100,0%
Especificidad	93,1%

Tabla 6: Resultados del análisis de 200 sueros de donantes de sangre procedentes de un centro de donación de Alemania

	negativo	valores límite	positivo
200 Sueros	92%	4%	4%

Bibliografía

1. Flisser, A. and Larralde, C., Immunodiagnosis of Parasitic Diseases, Vol. 1, Helminthic Diseases, Academic Press, pg. 109-161 (1986)
2. Gottstein et al., Trop. Med. Parasit., 38, 299-313 (1987)
3. Larralde, C. et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 35 (5), 965-973 (1986)
4. Tsang, V. et al., J. Infect. Dis., 159 (1), 50-59 (1989)