

ELI.H.A *Echinococcus*

Serodiagnóstico de la hidatidosis por hemaglutinación indirecta

102 pruebas
(Ref. 66604)

8000140-ES-2012-01

Para uso en diagnóstico *in vitro*, sólo para uso profesional.
Pruebas de un solo uso.



1 - FINALIDAD

ELI.H.A *Echinococcus* permite la determinación cuantitativa por hemaglutinación indirecta de anticuerpos séricos dirigidos contra el *Echinococcus granulosus*. Cada kit permite realizar 102 pruebas o 17 reacciones de 6 diluciones.

2 - INTRODUCCIÓN

La hidatidosis o equinococosis es una enfermedad parasitaria causada por larvas (hidátides) de un cestodo del género *Echinococcus*. El ciclo de vida del *Echinococcus granulosus* necesita tanto huéspedes definitivos como intermedios. En general, el perro es el huésped definitivo, y las ovejas y, en casos raros, los seres humanos, son los huéspedes intermedios.

Los hidátides se encuentran más frecuentemente en el hígado (50% - 70%), seguido por los pulmones (25% - 40%).

La hidatidosis *E. granulosus* se caracteriza por una progresión lenta e insidiosa de la enfermedad.

La infección es relativamente asintomática, con diagnóstico biológico básicamente inmunológico por detección de anticuerpos.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A *Echinococcus* se basa en el principio de la hemaglutinación indirecta. Los eritrocitos sensibilizados están compuestos por eritrocitos de cordero recubiertos con un antígeno *Echinococcus granulosus*.

La presencia de anticuerpos séricos de *Echinococcus granulosus* resulta en la aglutinación de los glóbulos rojos sensibilizados que se traduce por un depósito turbio de color rojo/marrón que recubre las cúpulas. En ausencia de anticuerpos específicos, los eritrocitos forman un depósito similar a un anillo en el fondo de la cúpula.

Los glóbulos rojos no sensibilizados garantizan la especificidad de la reacción que permite eliminar cualquier interferencia de las aglutinaciones naturales anti-cordero (heteroanticuerpos Forssman, anticuerpos de la mononucleosis infecciosa...).

La reacción se efectúa en una placa con fondo en forma de U.

La manipulación es simple y rápida. Los resultados se obtienen en 2 horas.

4 – REACTIVOS Y MATERIAL

Descripción	Cantidad
R1 : Frasco de 2,2 mL de glóbulos rojos sensibilizados	1
R2 : Frasco de 1 mL de glóbulos rojos no sensibilizados	1
BUF : Frasco de 55 mL de tampón fosfato pH 7,2	1
R3 : Frasco de 2 mL de adsorbente	1
CONTROL + : Frasco de 0,2 mL de control positivo titulado	1
CONTROL - : Frasco de 0,2 mL de control negativo	1
MICROPLATE : Microplaca con fondo en U	2
DROPPER : Cuentagotas especial	2

5 - PRECAUCIONES

- Los reactivos están destinados a un uso *in vitro* únicamente y deben ser manipulados por personal capacitado para ello.
- Las pruebas son de un solo uso.
- Todos los reactivos, excepto el reactivo **BUF**, contienen sustancias de origen animal y deben ser manipulados de acuerdo con las precauciones de uso.
- Las muestras de pacientes son potencialmente infecciosas. Deben ser manipuladas de acuerdo con las precauciones de uso, de conformidad con las normas de higiene y la normativa vigente para este tipo de producto en el país de uso.
- Los frascos **CONTROL** contienen azida sódica (concentración < 0,1%).
- No usar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- No usar reactivos de lotes distintos.
- Antes de usar, esperar a que los reactivos estén a temperatura ambiente (18-25 °C).
- Agitar con cuidado los reactivos **R1** y **R2** antes de usarlos.
- En el momento de distribuir los reactivos **R1** y **R2**, asegurarse de que el cuentagotas esté perfectamente vertical. Comprobar que no haya burbujas de aire en las gotas para que los volúmenes suministrados sean constantes.

6 – RECOGIDA DE MUESTRAS Y TRATAMIENTO

Utilizar suero fresco o conservado a -20°C y que no presente signos de hemólisis turbia ni de contaminación.

Evitar las congelaciones y descongelaciones repetidas.

No descomplementar el suero.

7 – CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para usar.

Los reactivos almacenados a 2° - 8°C en sus envases originales se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja. No congelar.

8 – MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas automáticas con volumen de pipeteo adaptado al volumen que va a medirse;
- Recipiente para desechos contaminados;
- Centrifugadora;
- Tubos para hemólisis.

9 – MÉTODO

Llevar los reactivos a temperatura ambiente antes de usarlos.

9.1 - Preparación de la muestra

Diluir el suero a analizar a 1/40:

- 50 µL de suero;
- 1,95 mL del reactivo **BUF**.

9.2 - Realización de la prueba en una microplaca

- Utilizar una pipeta de varios canales, añadir 50 µL de reactivo **BUF** en 8 cúpulas de la microplaca.

- Con una micro pipeta, añadir 50 µL de suero diluido en la 1ª cúpula. Mezclar el suero con el reactivo **BUF** y realizar una dilución en serie, preferentemente con un micro diluidor, transfiriendo unos 50 µL de la cúpula nº1 a la nº2, después de la 2ª a la 3ª, y así sucesivamente hasta la cúpula nº 6 y rechazando los últimos 50 µL de la cúpula nº 6. De esa manera, se obtienen diluciones de 1/80 hasta 1/2560.

- Añadir 50 µL de suero diluido a la cúpula nº 7.

Mezclar el suero con el reactivo **BUF** y desechar 50µL.

Esa dilución (1/80) constituye el suero de control cuya función es detectar las aglutininas naturales anti cordero que pueden aparecer en determinados sueros.

- Agitar con cuidado los reactivos **R1** y **R2**.

- Añadir 1 gota del reactivo **R1** a las 6 primeras cúpulas.
- Añadir 1 gota del reactivo **R2** a la cúpula nº7 (suero de control).
- Añadir 1 gota del reactivo **R1** a la cúpula nº8 (reactivo de control), cuya función es controlar la validez del reactivo **BUF** y del reactivo **R1**.

Nota: Realizar únicamente un reactivo de control por cada serie de pruebas.

- Homogeneizar muy cuidadosamente el contenido de las cúpulas.
 - bien manualmente, dando golpecitos laterales sobre los lados de la microplaca, colocada en plano;
 - bien mediante un agitador vibrador para placas de micro titulación (por ejemplo, a 1300 rpm durante 10 segundos). No utilizar un agitador orbital.
- Después, dejar la placa inmóvil, lejos de cualquier tipo de vibración.

- Leer la reacción una vez transcurridas 2 horas.

9.3 - Adsorción de las aglutininas anti cordero naturales en caso de aglutinación del suero de control

- Agitar con cuidado el reactivo **R3**.
- En un tubo, añadir y mezclar:
 - 0,1 mL de suero;
 - 0,3 mL de reactivo **R3**.
- Incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
- Colectar el sobrenadante; el suero estará diluido a 1/4.
- Diluir el sobrenadante a 1/10 en el reactivo **BUF** para obtener una dilución "madre" adsorbida de 1/40.
- Seguir las etapas descritas el párrafo "Realización de la prueba en una microplaca", pero sustituyendo la dilución "madre" por la dilución "madre" adsorbida.

10 – LECTURA

Reacción negativa: Ausencia de hemaglutinación.
Presencia de un anillo más o menos ancho en el fondo de la cúpula.

Reacción positiva: Presencia de hemaglutinación.
Presencia de una película roja / marrón que cubre la cúpula; a veces, presencia de un borde fino periférico.

Ejemplo: Suero positivo en una dilución de 1/1280



11 - INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Título < 1/160: Reacción no significativa
Probable ausencia de hidatidosis.
Hacer de nuevo la prueba 2 ó 3 semanas después y hacer también una prueba de electroinmunoanálisis o de inmunoelectroforesis.

Título = 1/160: Reacción dudosa.
Hacer de nuevo la prueba 2 ó 3 semanas después y hacer también una prueba de electroinmunoanálisis o de inmunoelectroforesis.

Título ≥ 1/320: Reacción significativa a favor de una hidatidosis progresiva.

12 - CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Los reactivos **CONTROL+** y **CONTROL-** deben ser utilizados como los sueros que se van a analizar. La titulación del reactivo del **CONTROL+** debe ser misma que la titulación impresa en la etiqueta del frasco ± una dilución. El reactivo **CONTROL-** no debe presentar ninguna hemaglutinación. En caso de presencia de hemaglutinación, la prueba no será válida.

13 - CAUSAS DE ERRORES Y LÍMITES DE LA PRUEBA

- Incorrecta conservación del suero.
- Incorrecta conservación de los reactivos después de abrirlos.
- Utilizar únicamente los cuentagotas proporcionados en el kit.
- No intercambiar los cuentagotas entre los reactivos **R1** y **R2**.
- En el caso de reacción positiva en las 6 primeras cúpulas, continuar con la serie de diluciones para determinar la titulación límite de hemaglutinación.
- El suero de control debe dar una reacción negativa (anillo). En caso de hemaglutinación de este control, sería necesario repetir la prueba después de haber eliminado las aglutininas naturales anti cordero del suero por adsorción.
- El reactivo de control debe dar una reacción negativa (anillo). En caso de hemaglutinación de este control, el reactivo **ELI.H.A Echinococcus** no podrá utilizarse.
- Algunos sueros, cuya concentración de anticuerpos es muy alta, pueden dar lugar a un fenómeno de zona (con desaparición de la película) en las diluciones iniciales, que desaparece en las diluciones siguientes.
- La calidad de los reactivos permite hacer las diluciones por la tarde y leer la prueba a la mañana siguiente, a condición de que la microplaca no se mueva y quede protegida de las vibraciones.
- En todos los casos y antes de establecer el diagnóstico final, la interpretación de la prueba debe realizarse teniendo en cuenta el conjunto de datos clínicos, epidemiológicos y biológicos, así como los resultados de otras pruebas.

14 - EFICACIA

ELI.H.A *Echinococcus* está formado por glóbulos rojos sensibilizados con un antígeno de *Echinococcus granulosus* que asegura la especificidad y la sensibilidad de la reacción. Un estudio realizado con 221 sueros humanos demostró una sensibilidad del 93,0% (con independencia de la localización de los quistes hidatídicos) y una especificidad del 94,9%. Las comparaciones con las pruebas IFI y ELISA han demostrado un notable grado de complementariedad entre estas diferentes reacciones (2).

15 - ELIMINACIÓN DE LOS DESECHOS

Los desechos deben ser eliminados respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor para este tipo de productos en el país de utilización.

En caso de vertido accidental del reactivo **BUF**, limpiar el plano de trabajo con un papel absorbente y enjuagar con agua.

En caso de vertido accidental del suero u otro reactivo, limpiar con lejía y papel absorbente

16 – BIBLIOGRAFÍA

1. CAPRON, L. YARZABAL, A. VERNES, J. FRUIT - Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine - Path. - Biol., 1970, Vol. 18, n° 7-8, 357-368.
2. P. AMBROISE-THOMAS, P.-T. DESGEORGES, M. BAYARD, A. GROS - L'hémagglutination indirecte dans le séro-diagnostic de l'hydatidose. Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA - Lyon Médical, 1979, 241, 755-759.
3. P. WATTRE, M. CAPRON, A. BEKHTI, A. CAPRON - Diagnostic immunologique de l'Hydatidose - La nouvelle presse médicale, 1980, 9, n°5, 305-309.
4. P. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie - Le Pharmacien Biologiste, Tome XIII, n°123, 417/55-60.

Los cambios desde la revisión anterior, están resaltados en gris



ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎ 33 (0)4 94 88 55 00

Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61

http://www.elitechgroup.com