

HIDATEST

PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Uso "In Vitro"
96 determinaciones de un título

APLICACION

HIDATEST puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de casos presuntivos de Hidatidosis o para ensayos epidemiológicos.

FUNDAMENTO DEL METODO

La Hidatidosis o Equinococosis Hidatídica, es una enfermedad ocasionada por el cestodo Echinococcus granulosus. Cuando el hombre se infecta, en los tejidos se desarrolla la forma quística.

La diferente capacidad inmunogénica de los quistes está relacionada con la salida de inmunógenos parasitarios que depende a su vez del estado fisiopatológico del quiste y sus membranas, siendo nula en quistes sanos (normales o Hialinos) y máxima en quistes con microfisuras en su membrana germinal. En consecuencia la formación de anticuerpos dependerá de estos factores inherentes al quiste y a su relación con el huésped.

Dentro de las técnicas inmunodiagnósticas aplicadas a la Hidatidosis la reacción de Hemaglutinación Indirecta fue introducida por Garabedian y col. en 1957.

Hidatest se prepara sensibilizando hematíes de carnero con antígeno obtenido a partir del líquido hidatídico, capaz de reconocer anticuerpos específicos del suero humano o de animales en estudio.

Dado que los antígenos del líquido hidatídico pueden ser comunes a otros organismos parasitarios, las reacciones cruzadas serían frecuentes sobre todo a bajas diluciones.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han permitido reducir las reacciones inespecíficas a títulos inferiores a $\frac{1}{4}$ por el uso simultáneo de adsorbentes en el Diluyente de Muestras y el tratamiento del suero con 2-Mercaptoetanol (agente reductor). En estas condiciones se consideran específicos los títulos de $\frac{1}{8}$ o superiores.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

Frasco N° 1: **Antígeno.** 3 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizados con antígeno obtenido a partir del líquido hidatídico. Agitar intensamente antes de usar.

2 Frascos N° 2: **Diluyente de Muestras.** 3 ml cada uno de solución salina isotónica con adsorbentes y conservadores.

Ampolla N° 3: 1 ml de 2-Mercaptoetanol (2-ME)

Frasco N° 4: **Control Positivo.** 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra E.granulosus, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infectivo. Listo para usar

Frasco N° 5: **Control Negativo.** 0,5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra E.granulosus, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Frasco N° 6: **Solución Proteica.** 0,5 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.

1 Frasco vacío para acondicionar el 2-ME una vez abierta la ampolla.

1 Policubeta descartable con 96 pocillos, fondo en “U”.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Microgoteros de 25 µl
- Microdiluidores o micropipetas calibradas de 25 µl
- Pipetas de 0.1 y 10 ml
- Espejo para lectura de policubetas o fondo blanco
- Papel de filtro
- Agua destilada o agua desionizada
- Solución fisiológica
- Recipientes adecuados para el tratamiento con 2-ME
- Baño de agua termostático a 37 °C o estufa a 37 °C.
- Cinta adhesiva

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha indicada en los rótulos. Guardar los componentes del kit entre 2 y 8 °C. Mantener los frascos en posición vertical una vez abiertos. **No congelar.**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico “In Vitro”.
 - Las muestras de sueros humanos y los controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
 - Todo material utilizado en la reacción debe ser considerado contaminado, debiendo ser inactivado con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos, ó autoclavado durante por lo menos 1 hora a 121,5°C.
 - Defectos en el volumen de dispensado del Control Positivo ocasionados por su viscosidad, puede dar títulos diferentes al declarado. Por eso es necesario extremar las precauciones en su manipulación.
 - No utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.
 - No mezclar reactivos de lotes diferentes.
 - Verificar que el volumen de las micropipetas o microdiluidores sea el correcto.
 - **No congelar el kit**, pues los glóbulos se autoaglutinan (formación de partículas sólidas macroscópicas). Si esto ocurre, debe descartarlo.
 - Si el suero fue tratado con 2-ME verificar que el mismo no se encuentre gelificado, finalizada la incubación post tratamiento. Si gelifica, tratarlo nuevamente realizando una dilución previa ½ con solución fisiológica.
- Sueros hiperlipémicos gelifican con más facilidad en el tratamiento con 2-ME.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antígeno (frasco N° 1): agitar enérgicamente el frasco antes de usar, hasta obtener una suspensión homogénea. Mantener el frasco en posición vertical una vez abierto. **No congelar.**

Diluyente de Muestras (frasco N° 2): antes de utilizar el Diluyente, agregar 150 µl de Solución Proteica (frasco N° 6) a cada frasco de diluyente (50 µl de Solución Proteica por ml de Diluyente). Preparar la cantidad necesaria para el uso inmediato, ya que solo es estable durante dos días si se mantiene entre 2 y 8 °C.

2-Mercaptoetanol (Ampolla N° 3): preparar una Solución de 2-ME 1/100 en Solución Fisiológica (CINa 0.85% P/V). Utilizar esta Solución solamente el día de su preparación.

Control Positivo y Negativo (frascos N° 4 y 5) están listos para usar, por lo tanto no requieren tratamiento con 2-ME. Estos controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para HBsAg y para anticuerpos contra HCV y HIV, adecuadamente inactivado. Sin embargo, todos los derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Emplear suero fresco y límpido. La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas siguiendo las normas generales, recogiéndola en tubos de centrífuga. Para obtener el suero dejar coagular la sangre, centrifugar y separar el sobrenadante.

Los sueros pueden ser conservados entre 2 y 8 °C hasta 48 horas, o congelados a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

PROCEDIMIENTO

TECNICA CUALITATIVA

Cuando las muestras de suero se tratan con 2-ME se establece como título de corte la dilución $1/8$. Por lo tanto siguiendo el procedimiento que se describe a continuación se podrán realizar 96 determinaciones cualitativas de un título en una policubeta. Los resultados reactivos deberán titularse posteriormente.

Los Controles Positivo y Negativo provistos en el kit están listos para usar, por lo tanto no deben ser sometidos al tratamiento con 2-ME.

1. Tratar previamente los sueros con 2-Mercaptoetanol diluido 1/100 (ver Preparación de los Reactivos) mezclando partes iguales de suero y 2-Mercaptoetanol diluido, en un recipiente adecuado (100 µl de suero más 100 µl de la solución de 2-ME).
2. Incubar 30 minutos en un baño de agua termostatizado a 37 °C o estufa a 37 °C.
3. Luego de la incubación agregar en el recipiente un volumen igual de Solución Fisiológica (200 µl).
4. Colocar 25 µl de Diluyente de Muestras (ver Preparación de los Reactivos) utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada en cada uno de los pocillos a emplear. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios por cada muestra y controles que desea investigar.
5. Con un microdiluidor de 25 µl tomar cada una de las muestras diluidas y tratadas previamente. Colocar cada microdiluidor en un pocillo de la policubeta en donde previamente se colocaron los 25 µl del Diluyente de Muestras.
6. Girar los microdiluidores entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta homogeneización de la dilución.

7. Retirar los microdiluidores y secarlos sobre papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.
8. Repetir los pasos 5 a 7 con cada muestra a investigar, con el Control Positivo (ver Precauciones y Advertencias) y el Control Negativo provistos en el kit.
Si utiliza una micropipeta automática de 25 µl para realizar esta operación, homogeneizar por carga y descarga, descartando 25 µl luego de hacer la dilución.
9. Depositar en cada pocillo 25 µl de Antígeno (Frasco N° 1) (ver Preparación de los Reactivos).
10. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
11. Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante 90 minutos.

Esquema del procedimiento cualitativo

Reacción con 2-ME en un recipiente adecuado	Suero	100 µl
	2-ME diluido 1/100 con solución salina fisiológica	100 µl
	Homogeneizar e incubar 30' en baño de agua a 37 °C o estufa a 37°C	
	Solución Fisiológica	200 µl
Homogeneizar		
Reacción en la Policubeta	Diluyente de Muestras (150 µl de Solución Proteica por cada frasco de Diluyente de Muestras)	25 µl
	Muestra diluida y tratada con 2-ME, Control Positivo y Control Negativo	25 µl
	Homogeneizar bien y retirar 25 µl	
	Antígeno agitado enérgicamente	25 µl
Agitar manualmente la policubeta durante 30 segundos		
Dejar la policubeta en reposo 90 minutos y leer		

TECNICA SEMICUANTITATIVA

1. Depositar con un microgotero o una micropipeta calibrada 25 µl de suero, Control Positivo y Control Negativo en los pocillos N° 1.
2. Agregarle solo a los sueros 25 µl. de 2-ME diluido 1/100 (ver Preparación de los Reactivos). A los Controles Positivo y Negativo agregarles 25 µl de Solución fisiológica.
3. Sellar la policubeta con cinta adhesiva y agitar durante 30 segundos.
4. Incubar la policubeta durante 30 minutos a 37 °C ó 120 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).
5. Retirar la cinta adhesiva.
6. Colocar con un microgotero o una micropipeta calibrada 25 µl de Diluyente de Muestras (ver Preparación de los Reactivos), a partir de los pocillos N° 2. Utilizar los pocillos necesarios hasta la dilución (título) de las muestras y controles que desea investigar.
7. Colocar un microdiluidor de 25 µl en cada pocillo N° 1.
8. Girar los microdiluidores entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta carga y homogeneización de los sueros y los Controles.
9. Transferir los microdiluidores a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada
10. Retirar los microdiluidores y secarlos con papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.

Si utiliza una micropipeta automática de 25 µl para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizar por carga y descarga, transfiriendo 25 µl de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25 µl.

11. Depositar con un microgotero o una micropipeta calibrada 25 µl de Antígeno (ver Preparación de los Reactivos) a partir de los pocillos N° 3 (dilución 1/8).
12. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
13. Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante 90 minutos. Para la lectura tomar en cuenta que en el primer pocillo el suero y los Controles se encuentran diluidos 1/2 y las diluciones se continúan en orden progresivo en los pocillos siguientes (1/4, 1/8, 1/16, etc.).

Esquema del procedimiento semicuantitativo

Reacción en la policubeta	
Suero, Control Positivo y Control Negativo	25 µl en los pocillos 1
2-ME diluido 1/100 con solución fisiológica	25 µl en los pocillos 1 con el suero solamente
Solución fisiológica	25 µl en los pocillos 1 con los Controles Positivo y Negativo
Sellar con cinta adhesiva. Agitar e incubar 30 minutos a 37 °C o 120 minutos a temperatura ambiente.	
Diluyente de muestras (150 µl de Solución Proteica por cada frasco de Diluyente de Muestras)	25 µl desde el pocillo 2 hasta el pocillo con la dilución que desea investigar
Transferir 25 µl desde el pocillo 1 hasta el pocillo con la dilución que desea investigar, despreciando los últimos 25 µl	
Antígeno agitado enérgicamente	25 µl desde el pocillo 3 en adelante
Agita la policubeta manualmente durante 30 segundos. Dejar la policubeta en reposo 90 minutos y leer.	

Tabla de dilución

Pocillo	Dilución	Título
1	1/2	2
2	1/4	4
3	1/8	8
4	1/16	16
etc.	etc.	etc.

LECTURA

Luego de transcurridos 90 minutos, proceder a la lectura en espejo para policubetas o sobre un fondo blanco.

REACCIÓN POSITIVA: formación de un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

REACCIÓN NEGATIVA: formación de un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

CRITERIO DE ACEPTABILIDAD DEL ENSAYO

La inclusión de un Control Positivo y Negativo permite verificar la reproductibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y llamar la atención sobre posibles errores de técnica.

El título del Control Positivo se indica en su correspondiente etiqueta y no debe variar más de un orden de dilución (± 1 título) durante todo el período de vigencia del kit. (Ver precauciones y advertencias).

El Control Negativo debe dar reacción negativa durante todo el período de vigencia del kit.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El **título del suero** será la inversa de la dilución que da lugar a un manto que ocupe 50% o más del pocillo.

Estudios realizados con nuestro kit sobre 9242 sueros en áreas rurales de la Pcia. de Buenos Aires (en el Departamento de Zoonosis Rurales de Azul) nos permiten determinar que utilizando el método que incluye el tratamiento con 2-ME de las muestras, las personas presumiblemente no parasitadas en más del 99% de los casos no superan el título $\frac{1}{4}$.

En individuos portadores de quistes los títulos observados fueron en un 98.5% de los casos mayores a la dilución $\frac{1}{8}$. Todos los sueros fueron estudiados en paralelo con la reacción DD5 (Doble difusión para Arco 5) y sobre el 20% de los mismos (1933 sueros) se realizaron confirmaciones con la técnica de Enzimoimmunoensayo Pharmacia Echinococcus sp. IgE específico y ecografías.

En consecuencia se informará:

Suero reactivo: Aquellos que tengan títulos iguales o superiores a $\frac{1}{8}$.

Suero no reactivo: Aquellos que tengan títulos inferiores a $\frac{1}{8}$.

Si desea trabajar sin el tratamiento previo de las muestras con 2-ME, los sueros no reactivos pueden alcanzar títulos hasta $\frac{1}{32}$ considerando sueros reactivos aquellos que superen el título $\frac{1}{64}$.

Los sueros con resultado "reactivo" en la determinación cualitativa, deben ser confirmados mediante el procedimiento semicuantitativo.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Sensibilidad: En los estudios poblacionales así como en el análisis de paneles de sueros reactivos para anticuerpos contra Echinococcus granulosus, procedentes de individuos portadores de quistes, el Hidatest detectó el 100% de los sueros, en total concordancia con la reacción de doble difusión para Arco 5 (DD5).

Especificidad: En los estudios poblacionales así como en el análisis de sueros no reactivos para anticuerpos contra Echinococcus granulosus y reactivos para otras parasitosis se alcanzó una especificidad superior al 99%, utilizando el tratamiento sistemático de las muestras de suero con 2-Mercaptoetanol.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. HIDATEST, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo ya que éste debe basarse en la correlación de los resultados de más de un test con los datos clínicos. En ese sentido, todo título debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

No se ha demostrado hasta el momento que los títulos serológicos estén relacionados con la gravedad patológica en la Hidatidosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Knobloch, J.; Lederer, I.; Mannweiler, E.: Species-specific immunodiagnosis of human Echinococcosis with crude antigen. *J. Clin. Microbiol.* 3(6): 554-555 (Dec. 1984).
2. Larrieu, E.J.; Varela Díaz, V.M.; Medina, M.; Coltorti, E.A. y Coniglio, R.: Hidatidosis humana: Aporte del inmunodiagnóstico a la detección, notificación y registro de casos en la Provincia de Río Negro, Argentina. *Bol. Chile Parasit.* 38: 3-9 (1983).
3. Bout, D.; Carlier, Y. & Capron, A.: Immunodiagnosis of Hydatidosis using monospecific immune serum anti Ag 5. *Biomedicine* 31: 214-215 (1979).
4. Coltorti, E.A. y Varela Díaz, V.M.: Inmunología e inmunodiagnóstico de la Hidatidosis humana. *Medicine Argentina* 6: 135-147 (1978).
5. Dottorini, S. & Tassi, C.: Echinococcus granulosus: Characterization of the main antigenic component (arc 5) of Hydatid fluid. *Exp. Parasitology* 43: 307-314 (1977).
6. Apt, W.: Avances en el diagnóstico inmunológico de la Hidatidosis. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* (Jul.1975).
7. Bout, D. ; Fruit, J. et Capron, A.: Purification d'un antigène spécifique de liquide hidatique. *Ann. Immunol. (Inst.Pasteur).* 125 C : 775-788 (1974).
8. Williams, J.F. y Prezioso, U.: La prueba de hemaglutinación indirecta para Hidatidosis empleando células tratadas con glutaraldehído. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 13(5): 333-335. (Set./Oct. 1971).
9. Goodchild, C.G. & Kagan, I.G.: Comparison of proteins in hydatid fluid and serum by means of electrophoresis. *The Journal of Parasitology.* 47(2) (April 1961).
10. Kagan, I.G., et al.: Studies on echinococcosis: Nonspecific serologic reactions of hydatid-fluid antigen with serum of patients ill with diseases other than echinococcosis. *Am. J. Trop. Med.* 84: 635-640 (1960)

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com

www.lab-lemos.com

Autorizado por A.N.M.A.T. Certificado. N° 001490.

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA
A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Industria Argentina