

## **MANUAL DE INSTRUCCIONES:**

1) **NOMBRE DEL PRODUCTO:** IFIFLUOR MULTITEST HIDATIDOSIS (E. granulosus)

2) **USO AL QUE ESTA DESTINADO:**

Equipo de inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos anti-Echinococcus granulosus en suero humano para el diagnóstico de Hidatidosis. Uso in vitro.

3) **NUMERO DE UNIDADES DE ANALISIS:**

El equipo permite 20 - 40 - 60 determinaciones de sueros individuales.

4) **FUNDAMENTO DEL METODO:**

Distintas pruebas han sido utilizadas para el diagnóstico de la hidatidosis, infección por Echinococcus granulosus (1). Se considera que la prueba de referencia es la inmunoelectroforesis basada en la detección del "arco 5" que es altamente específica, ya que no se han encontrado resultados positivos en pacientes no hidatídicos (6). Las pruebas de hemaglutinación y látex presentan algunas limitaciones y se requiere tanto la titulación de cada lote de antígeno como la posterior verificación de los resultados por arco 5. La intrademoreacción de Casoni tiene una tasa variable de inespecificidad que depende del antígeno y del criterio de lectura, presentando falsos positivos en pacientes no hidatídicos (6).

Se ha recomendado la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre sustrato de escolex del parásito (8,9), por ser altamente sensible y específica (7). Esta técnica presenta, además, notorias ventajas en cuanto a rapidez y practicidad (4).

El equipo IFIFLUOR MULTITEST HIDATIDOSIS emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos séricos dirigidos contra el Echinococcus granulosus. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen cortes de escolex de E. granulosus. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico. Luego de lavar para eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC. Un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

5) **RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO**

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LAS MUESTRAS: El suero debe ser inactivado por 30 min a 56°C y luego se realiza una dilución 1/40. Por ejemplo 0,1ml de suero en 3,9 ml de buffer BFS. De ser necesario titular, hacer las diluciones con buffer BFS. **NO DILUIR LOS CONTROLES DEL EQUIPO, SON LISTOS PARA USAR**

3. PREPARACION DE LAS IMPRONTAS:

A) Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente o con secador de cabello.

B) Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Tener la precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.

4. INCUBACION: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en cámara húmeda o tapando la bandeja de incubación para evitar la evaporación de las muestras.

5. LAVADO: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS y reemplazarlo por BFS fresco, dejar reposar 5 minutos más. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.

6. INCUBACION CON ANTIGAMMA GLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA. (diluir la previamente con BFS según rótulo). Sacar los portaobjetos del baño con BFS. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubirlas con la ANTIGAMMA. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos, en cámara húmeda o tapando la bandeja de incubación para evitar la evaporación de las muestras.

7. LAVADO: Repetir paso 5.

8. MONTAJE: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar entre las áreas con un papel de filtro cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos **escrupulosamente limpios** y con una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de



tiene una alta sensibilidad para detectar anticuerpos. Sin embargo la sensibilidad puede ser afectada por una variedad de factores externos (tipo de microscopio, intensidad de la lámpara y su tiempo de uso, sistema de filtros, la aptitud del observador, etc). La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con cortes de escólices como antígeno está entre los métodos recomendados para el diagnóstico de hidatidosis (2, 3). Los cortes de escólices son considerados como el material antigénico más satisfactorio para la reacción de inmunofluorescencia, pues reaccionan tanto los orto como los meta escólices. Típicamente los sueros positivos presentan títulos altos (media de 1/420), siendo la dilución significativa 1/40 (3). Luego de la resección quirúrgica de los quistes, los títulos pueden ascender transitoriamente descendiendo a posteriori.

**Precisión:** Se han realizado repeticiones del ensayo para una serie de 10 sueros positivos, de diferentes títulos, incluyendo positivos débiles y fuertes. En ningún caso los resultados difirieron en más de un título, tanto intraensayo como interensayo.

**Especificidad:** Se han testado sueros positivos para diferentes patologías autoinmunes y parasitarias no producidas por *E. granulosus*, obteniéndose en todos los casos resultados negativos. La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**Estabilidad:** Conservando el equipo en las condiciones especificadas, el material no sufre deterioro dentro del plazo de actividad fijado. La anti-gamma diluída no debe reutilizarse y debe ser preparada fresca en cada ensayo. El buffer BFS es estable durante 4 semanas a 2-8°C. Se recomienda filtrar el BFS una vez reconstituido.

### **13) PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO. LIMITACIONES DEL METODO, SUSTANCIAS INTERFERENTES, ETC.**

#### **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

-Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles de este equipo han sido encontrados no reactivos para la presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti-virus de inmunodeficiencia humana 1y 2 (HIV-1+2) y Hepatitis C. Dado que ningún test diagnóstico puede ofrecer una seguridad absoluta acerca de la ausencia de los virus HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos basados en productos humanos deben ser tratados como potencialmente infectivos.

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.

-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de Petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores). Después de los pasos de lavado, se recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del portaobjetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas.

-Algunos de los componentes de este equipo contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas. Cuando se descarten los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de estos compuestos.

-Nunca pipetear con la boca o permitir que muestras de pacientes entren en contacto con la piel.

-Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos, muestras y materiales para limpieza deben ser descartados de manera de inactivar los agentes infecciosos. Se recomienda utilizar en la descontaminación, hipoclorito de sodio al 1%, durante un tiempo igual o mayor a 30 minutos.

-Sólo para uso diagnóstico in vitro.

#### **LIMITACIONES**

-El usuario del equipo debe leer cuidadosamente el inserto. El cumplimiento estricto del protocolo es indispensable para obtener resultados confiables. Ante cualquier duda comunicarse con nuestro Servicio de Asesoría Técnica.

-El exceso de lípidos en el suero a testear produce una reacción "filming" (película que encubre la reacción específica). No confundir con reacción positiva.

-La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**14) BIBLIOGRAFIA:**

- 1-KELEN AE Y COL., CAN.J. MICR. 8:545-554, 1962
- 2-SABIN AB Y COL., SCIENCE 108: 660-663, 1975
- 3-ANDERSON SE Y COL., SOUTH MED. J. 6: 1433-1443, 1975.
- 4-KATZ S, ROQUEL L, LABORATORIO IFI, ESTUDIOS INTERNOS
- 5-PYNDIAHY N Y COL., J. CLIN. MICROBIOL. 9:170-174, 1972
- 6-VARELA DIAZ VM, YARZABAL LA. TECNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE LA HIDATIDOSIS. OSP.
- 7- X CONGRESO INTERNACIONAL DE HIDATIDOSIS, PERU, 1972.
- 8-YARZABAL L, AVERNES C, FRUIT J., PATH. BIOL. 1970, 18: 358-365.
- 9-CONDERT J, AMBROISE P, THOMAS A, TRUONG THAI K, POTHIER MA, CONCERNANT LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE DU KISTE HIDATIQUE POR UNE NOUVELLE TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE SUR LAMES. BULL SOC. PATH. EXP. 1967, 6: 555-563.

**15) ESTABLECIMIENTO IMPORTADOR Y/O ELABORADOR. NOMBRE DEL DIRECTOR TECNICO, DOMICILIO LEGAL Y EN CASO DE PRODUCTOS IMPORTADOS TOTALMENTE TERMINADOS O FRACCIONADOS DEBERA CONSTAR EL ORIGEN DE ELABORACION (NOMBRE DE LA FIRMA Y DIRECCION)**

Establecimiento elaborador: LABORATORIO IFI  
Directora Técnica: Bioq. Liliana Roquel  
Domicilio Legal: Chile 523 (1603) Villa Martelli - Buenos Aires

**16) LEYENDA “PRODUCTO DE DIAGNOSTICO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, NUMERO”**

Producto de diagnóstico autorizado por el Ministerio de Salud y Acción Social Nro.