

MegaELISA® DIRO Antigen ad us. vet.

Inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección cualitativa de antígenos de *Dirofilaria immitis* en plasma o suero canino

Diagnóstico *in vitro*

INSTRUCCIONES DE USO

Art. No. 989096EG1 (96's)

Fabricante:



Lochauer Str. 2
A-6912 Hörbranz – AUSTRIA
☎ (+43) 5573 85400
📄 (+43) 5573 85400-4
✉ info@megacor.at
🌐 www.megacor.com

MegaELISA® DIRO Antigen ad us. vet.

Tabla de contenido	Página
1. Introducción	3
2. Indicación de uso	3
3. Principio de la prueba	4
4. Componentes del kit de análisis	4
5. Estabilidad y almacenaje	5
6. Información sobre la muestra	5
7. Preparación para la prueba	6
8. Procedimiento	7
9. Evaluación de prueba	8
10. Precauciones y advertencias	9
11. Responsabilidad	10
12. Instrucción de uso abreviada	11
Abreviaturas	2

Abreviaturas

- H_2O_2 Agua oxigenada
- PRP Peroxidasa de rábano picante
- TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina

1. INTRODUCCIÓN

La dirofilariosis del perro, pero también del gato, hurón y otros carnívoros, está causada por el nemátodo de la familia de las filarias *Dirofilaria immitis*. El hombre (falso huésped) se puede afectar como huésped accidental (zoonosis). Se manifiestan especialmente en pulmones y tejido conjuntivo, pero raramente son diagnosticadas.

La transmisión se produce por mosquitos hematófagos (Culicidae) infectados, que liberan con su picadura larvas (estadio L3) infecciosas de *D. immitis* a la sangre del huésped. Tras el desarrollo de las larvas (estadio 4) en la hipodermis del huésped (aprox. 8 días post infección), migran al torrente circulatorio. El establecimiento de los adultos (macrofilarias: hasta 1 mm de grosor 20–30 cm de longitud) se produce como pronto a los 80 días post infección, la mayoría de ellas en la arteria pulmonar y en el corazón derecho. Los parásitos hembra adultos (de las macrofilarias bisexuales) producen nuevas larvas (L1, microfilarias) como pronto a los 6 meses. Estas se liberan junto con antígenos del tracto reproductor femenino a la sangre periférica (microfilaremia), de donde son captadas de nuevo por los mosquitos. En los mosquitos la larva 1 se desarrolla de nuevo hasta la larva 3 infecciosa. El grado de enfermedad depende de la cantidad de nemátodos adultos (“carga parasitaria”, normalmente más de 30), localización, duración de la infección y la reacción inmunitaria del huésped. En lo que a la carga parasitaria respecta, perros y gatos son muy diferentes.

En primer lugar, la dirofilariosis es una enfermedad cardiopulmonar que al inicio transcurre asintómicamente. En estados avanzados, aparecen insuficiencia cardiaca derecha y cor pulmonale con síntomas como tos, dificultad para respirar, murmullos pulmonares y cardíacos, edema y fatiga rápida. Especialmente en perros pequeños con elevada carga parasitaria, se produce el “síndrome de la vena cava” (estenosis obstructiva por el acúmulo masivo de nemátodos en la vena cava caudal y el atrio derecho) y produce hemólisis intravascular, shock, fallo renal y muerte súbita.

Debido al diagnóstico clínico difícil y a la microfilaremia corta y transitoria, se recomienda un análisis repetido con **MegaELISA® DIRO Antigen**.

Siendo rápido y fiable, el **MegaELISA® DIRO Antigen** detecta antígenos específicos de grupo del tracto reproductivo de la hembra adulta de *D. immitis*. Debido al largo periodo de incubación de 6 meses post infección o después de una estancia en áreas de dirofilariosis, el análisis con el **MegaELISA® DIRO Antigen** debe realizarse como mínimo 6 meses después de una estancia en áreas de dirofilariosis.

MegaELISA® DIRO Antigen se ha basado en anticuerpos altamente específicos para la detección rápida y fiable de *Dirofilaria immitis* en plasma o suero de caninos infectados.

2. INDICACIÓN DE USO

El **MegaELISA® DIRO Antigen** es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de antígenos de *Dirofilaria immitis* en plasma o suero canino.

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El **MegaELISA® DIRO** Antigen se basa en la detección de inmunoensayo cualitativo de antígenos de *Dirofilaria immitis* en el principio sándwich.

Los anticuerpos monoclonales contra los antígenos circulantes de *Dirofilaria immitis* se unen a la superficie de los pocillos de la placa de microtitulación. Las muestras diluidas se pipetea en los pocillos de la placa de microtitulación junto con el conjugado contra *D. immitis* marcado con peroxidasa de rábano picante (PRP) para su incubación a temperatura ambiente (20–25 °C). El conjugado no unido se elimina mediante lavado. Tras la adición de sustrato (tetrametilbencidina, TMB), para muestras positivas, la encima unida convierte la solución incolora en los pocillos de la placa de microtitulación en una solución azul que se puede leer visualmente.

4. COMPONENTES DEL KIT DE ANÁLISIS

4.1. COMPONENTES SUMINISTRADOS EN EL KIT DE ANÁLISIS

Los reactivos contenidos en el kit de análisis son suficientes para 96 determinaciones.

1. **Placa de microtitulación** con 12 tiras separables de 8 pocillos, recubiertos con anticuerpos monoclonales contra *D. immitis*
2. **60 ml Tampón de lavado (10x), tapa transparente**
3. **1,5 ml Control Positivo**, listo para su uso, **tapa roja**
4. **1,5 ml Control Negativo**, listo para su uso, **tapa blanca**
5. **9 ml Conjugado** (Anticuerpos contra *D. immitis*, marcados con peroxidasa de rábano picante, listo para su uso), **tapa verde**
6. **9 ml Sustrato** (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina [TMB]/agua oxigenada [H₂O₂]), listo para su uso, **tapa azul. No exponer a la luz directa del sol.**
7. **100 puntas de pipeta**
8. **1 micropipeta**
9. **1 hoja de evaluación**
10. **1 papel de plástico para cubrir**
11. **1 instrucciones de uso**

4.2. COMPONENTES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada
- Vortex-Mixer / Mezclador vortex
- Papel de filtro/toallitas de laboratorio
- Cilindro de medición (1000 ml)
- Cronógrafo
- Lavadora para los pocillos de la placa de microtitulación o pipeta multicanal (300 µl)
- Papelero con la una solución 0,5% de hipoclorito

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE



Almacenamiento
2–8 °C



Usar antes de
– ver etiqueta



Para el uso
veterinario

LOT

Número de lote



Diagnóstico *in vitro*



No utilizar reactivos de
otros kits de análisis,
número de lote o pasada
la fecha de caducidad



Seguir las instrucciones
de uso detenidamente

Se debe evitar contaminación microbiana. Después de la fecha de caducidad no hay garantía de calidad, se puede dar más.

Retirar el número necesario de tiras de microtitulación, añadir el resto de inmediato en la bolsa, sellar y almacenar a 2–8 °C.

Debe evitarse un efecto directo de la luz sobre el sustrato incoloro, debe evitarse para prevenir la descomposición o coloración azul por autooxidación. Si el exterior se convierte en coloración azul, el sustrato ya no podrá ser utilizado.

6. INFORMACIÓN SOBRE LA MUESTRA

- Solamente plasma o suero de origen canino podrá ser utilizado como material de muestra.
- Homogeneizar la muestra adecuadamente antes de su uso.
- Si las muestras a analizar no han mantenido refrigeradas (**20–25 °C**), se deberían analizar en un plazo de 4 horas. Conservadas a **2–8 °C**, el plasma o suero se puede analizar hasta un plazo máximo de 5 días. Las muestras de plasma o suero se pueden dividir en alícuotas y conservar permanentemente a una temperatura de –20 °C. Evite la congelación y descongelación repetida.
- Algunas muestras lipémicas o hemolíticas pueden causar una coloración de fondo. Si este es el caso, se recomienda que la prueba se realice con muestras de mayor calidad.
- Tenga en cuenta, que tanto las muestras como todos los componentes del kit de análisis, deberían estar a temperatura ambiente en el momento de su utilización.
- **ATENCIÓN:** Tubos con EDTA, citrato o heparina parcialmente llenos o insuficientemente homogeneizados, puede causar efectos de interferencia que pueden conducir a diferentes resultados de las pruebas.

- Si existe sospecha de “falso negativo” y síntomas clínicos de dirofilariasis (ver punto 9.3/interpretación de los resultados de la prueba), se recomienda el tratamiento térmico del plasma/suero antes de la prueba para aumentar la sensibilidad de la detección del antígeno.

Caliente el plasma/suero (al menos 1 ml) en un termostato de bloque a 103°C durante 10 minutos. A continuación, centrifugue inmediatamente el coágulo resultante durante 5 minutos a 16 000×g (óptimo, alternativamente de 8 000 a 12 000×g). El sobrenadante así obtenido se puede utilizar como material de muestra para realizar el ensayo.

7. PREPARACIÓN PARA LA PRUEBA



Seguir las instrucciones de uso detenidamente. Para la fiabilidad de los resultados, es necesario seguir las instrucciones de uso exactamente. Realice todas las etapas del ensayo en el orden indicado y sin demora. Para cada paso de pipeteado se recomienda utilizar materiales desechables.

7.1. GENERAL

- Las tiras de microtitulación solo deben retirarse del envase después de que se haya alcanzado la temperatura ambiente. Para evitar pérdidas por evaporación es aconsejable cubrir o enmascarar las tiras.
- Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de su uso.
- Después de su uso tanto en las tiras de microtitulación no utilizadas (en bolsas de aluminio selladas) así como los reactivos no utilizados deben almacenarse a 2–8 °C.
- Las tiras de microtitulación una vez utilizadas, no deben ser reutilizadas.
- Todos componentes del kit de análisis dañados no podrá ser utilizados.
- Un contacto directo de la muestra con los componentes del kit de análisis debe ser evitado (contaminación cruzada).
- Evite la luz solar directa durante la ejecución de la prueba.

7.2. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO 1:10

Una parte de tampón de lavado concentrado (60 ml) se mezclan con 9 partes de agua destilada (540 ml). Si se puede observar los cristales de concentrado de tampón de lavado, disolverlos calentando, el tampón de lavado se introduce en un baño de agua a 37 °C. El tampón así diluido se puede almacenar a 2–8 °C durante un año.

7.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS/DE LOS CONTROLES

- Las muestras se utilizan sin diluir.
- **ATENCIÓN:** Al usar un lavador para ELISA, las muestras deben estar libres de partículas. Para asegurar esto, introduzca las muestras en la centrífuga a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Los controles están listos para usar y no deben diluirse.

8. PROCEDIMIENTO

- Homogeneizar el material de las muestras bien antes de usar.
- Antes de comenzar la prueba, use la hoja de evaluación provista para determinar la posición correcta de las muestras de pacientes y los estándares/controles en las tiras de microtitulación. Se recomiendan determinaciones al menos por duplicado.
- Utilice puntas desechables limpias para cada paso de pipeteo.

8.1. APLICACIÓN DE LA MUESTRA Y PRIMERA INCUBACIÓN

- Introducir el número necesario de tiras de microtitulación en el bastidor soporté.
- Introduzca en cada pocillo
 - una gota de **Control Positivo (2x)**
 - una gota de **Control Negativo (2x)**
 - **30 µl de las muestras (2x)**en el orden que van a ser analizadas y en el respectivo pocillo de la tira de microtitulación.
- Introduzca **2 gotas de Conjugado** a cada pocillo de la placa de microtitulación.
- Cubrir la placa de microtitulación e incubar por **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C)**.

8.2. LAVADO – CUIDADOSO y ESTRICAMENTE y DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES

LAVADO A MANO

- Deseche el incubado a través de desembocar en un contenedor de desechos con hipoclorito. Elimine de acuerdo con las regulaciones locales.
- Evierta varias veces sobre un papel de laboratorio/pañó absorbente la placa de microtitulación.
- Lavar 5 veces con 300 µl de tampón de lavado cada pocillo.
- **Debiendo estar completamente vacío entre cada ciclo de lavado y luego golpear con cuidado varias veces en un lugar seco y sin uso.**

LAVADO CON LAVADOR PARA ELISA

- **ATENCIÓN:** Las muestras con partículas se debe quitar manualmente antes de la primera etapa de lavado (posible obstrucción de las agujas de lavado).
- El ajuste correcto del lavador de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Para obtener resultados óptimos de lavado de al menos 300 µl de tampón de lavado por pocillo y paso de lavado.
- Aspiración completa del líquido después de cada etapa de lavado.
- Después de la última etapa de lavado intenso de la placa, utilizar un papel secante de laboratorio/tela. No debe haber humedad residual que permanezca en los pocillos.

8.3. SEGUNDA INCUBACIÓN

- Introduzca **2 gotas de sustrato (TMB)** en cada pocillo de la placa de microtitulación.
- Cubrir la placa de microtitulación e incubar por **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C) y en la oscuridad.**

8.4. MEDICIÓN

- Después de una mezcla suave (golpeando suavemente en el borde de la placa) se lee visualmente el color de los pocillos individuales.

9. EVALUACIÓN DE PRUEBA

9.1. ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS – CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Para cada medición, los controles positivos y negativos se deben llevar a cabo para garantizar la estabilidad de los reactivos y establecer si la técnica empleada es la correcta.

La PRUEBA debe llevarse correctamente cuando

- **Control Positivo** coloración azul
- **Control Negativo** sin teñir

Una desviación de los valores requeridos puede presentarse como una neblina o coloración azul del sustrato incoloro antes de la adición a los pocillos puede ser un indicio de un daño del reactivo. Si no se obtienen los valores especificados, debe ser controlado como paso siguiente antes de repetir la prueba:

- La vida útil de los reactivos utilizados
- Operatividad de los equipos utilizados (calibración)
- El control visual de los componentes del kit de análisis, como contaminación o pérdidas; una solución de sustrato azulado y no debe ser utilizado.

9.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA

- Las muestras deben leerse después de al menos 10 pero no más de 15 minutos.
- Para facilitar la lectura, los pocillos deben sostenerse sobre una superficie blanca.

Resultado positivo

Aparece un color azul. La intensidad del color puede variar dependiendo de la cantidad de antígeno en la muestra.

Resultado negativo

Sin coloración de la muestra.

9.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

La interpretación del resultado del análisis obtenido se debe contemplar en el marco de la anamnesis, región endémica, la clínica y las posibilidades terapéuticas y profilácticas.

Posibles motivos de resultados de análisis falsos positivos

- Perros con dirofilarias adultas muertas permanecen antígeno-positivos durante aprox. 3–4 meses → Se recomienda un segundo análisis a los 4 meses.

Posibles motivos de resultados del análisis falsos negativos

- Perros con infecciones inferiores a los 6 meses.
- Carga parasitaria muy baja.
- Infecciones con presencia solamente de dirofilarias macho, infecciones con dirofilarias no gravídicas (infección de un solo sexo).
- Enmascaramiento antigénico por inmunocomplejos (medicación crónica con lactonas macrocíclicas [“medicamento de muerte lenta”], procesos inflamatorios). Recomendación: inactivación térmica del plasma o el suero (ver punto 6/información sobre la muestra).

9.4. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La contaminación bacteriana o repetidos ciclos de congelación y descongelación de la muestra pueden afectar los valores de absorbancia.
- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe considerarse como la causa después de haber llevado a cabo, una sola prueba. Para un diagnóstico concreto debe tenerse en cuenta tanto la clínica, la sintomatología, así como datos serológicos y endémicos regionales.

10. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Usar ropa de protección (guantes) y lávese las manos después de haber concluido la ejecución de la prueba.
- No comer o beber durante la ejecución de la prueba.
- El material de la muestra y los controles deben ser consideradas como potencialmente infecciosas y deben eliminarse de acuerdo a las indicaciones estipuladas después de la ejecución de prueba.
- No utilizar los reactivos de otros fabricantes junto con este kit de análisis.
- No utilizar reactivos de lotes diferentes en el kit diagnóstico.
- No intercambie las tapas de los reactivos.
- Cerrar los frascos de reactivos después de su uso inmediatamente con el fin de evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Evite toda contaminación microbiana de los reactivos.
- Después de abrirlo por primera vez, verifique que no haya contaminación microbiana en el frasco de reactivo antes de seguir usando en el kit de análisis.
- – El Tampón de lavado, los controles y el conjugado contienen 0,045% Proclin® 300 como conservante.
- – El Sustrato contiene agua oxigenada. **Debe evitarse el contacto con los ojos, la piel o las mucosas.**
- **ATENCIÓN:** ¡Los residuos líquidos que contienen la solución de parada deben neutralizarse antes de colocarlos en una solución de hipoclorito!
- Solo es de recomendar el uso de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.

- Nunca pipetear con la boca.
- Usar las etiquetas para la muestra y para el tubo de muestra asociado, de modo tal que se garantice la asignación exacta.
- Para cada muestra, utilizar un nuevo tubo de muestra.
- Durante las etapas de incubación y lavado, los pocillos deben ser cubiertos con el líquido completamente.
- Para evitar la contaminación cruzada y los resultados de prueba falsos, pipetear con cuidado las muestras y el conjugado en los pocillos.
- **MegaELISA® DIRO** Antigen ha sido diseñado y está pensado exclusivamente para su uso por personal calificado, que domina las buenas prácticas de laboratorio.

El procedimiento de prueba, la información, las precauciones y advertencias en las instrucciones que debe ser estrictamente observados. Cuando se utiliza el kit de prueba de dispositivos de diagnóstico, se validará el método de ensayo. No es recomendable cualquier cambio en el diseño, composición y procedimiento de la prueba, así como cualquier utilización en combinación con otros productos, que el fabricante no haya sido autorizado. El usuario es responsable por tales cambios. El fabricante no se hace responsable por los resultados falsos e incidentes asociados a estas indicaciones. No aceptara ninguna responsabilidad para cualquier resultado llevado a cabo por un evaluación visual o fotométrica.

11. RESPONSABILIDAD

Todo el riesgo relacionado con el uso de este producto es asumido por el comprador. El fabricante no se hace responsable de los daños indirectos, especiales o consecuentes que puedan resultar del uso, la ejecución y evaluación del análisis con este producto.

12. INSTRUCCIÓN DE USO ABREVIADA

PREPARACIÓN DE PRUEBA

Poner tiras de microtitulación y reactivos a **temperatura ambiente (20–25 °C)**.

Diluir el tampón de lavado 1:10 con agua destilada.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Introduzca **1 gota de Control Positivo y Negativo**
o **30 µl de las muestras de plasma o suero**
en un pocillo respectivo.

Introduzca **2 gotas de Conjugado**
en un pocillo respectivo. Agitar suavemente.

Cubrir e incubar **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C)**.

Lavar **5x** con **300 µl 1x de tampón de lavado**.

Introduzca **2 gotas de Sustrato (TMB)**
en un pocillo respectivo. Agitar suavemente.

Cubrir e incubar **10 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C)**
en la oscuridad.

Evaluación visual de los pocillos.

NOTAS Y COMENTARIOS