

FILARCHECK

Ensayo ELISA para la detección de antígeno de Filaria en muestras de suero o plasma

■ INTRODUCCION

La filariosis pulmonar, es una infestación parasitaria causada por helmintos, distribuida mundialmente, de hecho el parásito, ha sido descrito en los 5 continentes, con distintas frecuencias de infección. La filariosis cardiopulmonar en perros, está producida por el nematodo *Dirofilaria immitis*, que desarrolla parte de su ciclo en el corazón y los grandes vasos adyacentes.

El ciclo se inicia cuando un mosquito portador de larvas infectivas del parásito, pica a un perro. Las larvas permanecen a nivel dérmico durante 3-6 días para migrar más tarde por los capilares hacia hígado y nódulos linfáticos y finalmente al corazón y grandes vasos adyacentes en donde crece y alcanza su madurez.

En la actualidad el diagnóstico de esta patología, se basa en la identificación de microfilarias y/o en la detección de antígenos producidos por *Dirofilaria immitis* en el torrente sanguíneo de los animales sospechosos.

La detección de antígeno, puede revelar presencia de *Dirofilaria immitis*, incluso durante la "fase oculta" que acontece cuando la microfilaria no está presente en sangre debido bien a la respuesta inmune del propio hospedador o a los tratamientos farmacéuticos recibidos por el paciente. La detección de antígeno, también se considera de gran importancia a la hora de realizar un tratamiento específico a un animal infestado. De hecho el seguimiento de los animales tratados a intervalos adecuados durante la duración del tratamiento (normalmente cada 4 meses), en el caso de mantenerse siempre negativos, sería una clara y objetiva prueba de la efectividad del tratamiento.

■ BASE TECNICA DEL ENSAYO

El test se fundamenta en el principio del ELISA sándwich. Se suministran placas tapizadas con un anticuerpo monoclonal específico de antígeno circulante de *D. immitis*. El suero del perro sospechoso se añade sobre el pocillo. Si este suero, contiene antígeno, este será reconocido por el anticuerpo monoclonal inmovilizado y permanecerá unido al anticuerpo de tapizado.

Para revelar si se ha producido esta unión, se añade el conjugado. Este reactivo consiste en un anticuerpo monoclonal también específico para el antígeno circulante de *D. immitis*, pero que reconoce otra región o epítipo del mismo. En este caso el anticuerpo se ha marcado con un enzima. Si se ha producido la unión de antígeno al monoclonal inmovilizado en la placa, el conjugado se adherirá también de modo específico y tras lavar para eliminar todo el material no específicamente unido, podremos añadir el sustrato específico del enzima que constituye el marcaje, y observaremos la aparición de una reacción colorimétrica. Esta solo aparecerá en el caso de que la muestra ensayada contenga antígeno de *D. immitis* y no aparecerá en los casos en los que la muestra proviene de un animal no infestado.

■ OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Obtener una muestra de sangre del animal a analizar. Centrifugarla para separar el plasma o suero.

Es preferible la utilización de suero o plasma obtenido de una muestra de sangre reciente. Los sueros hemolizados o lipémicos, aunque pueden utilizarse, son menos convenientes ya que podrían dar lugar a la aparición de "fondos" inespecíficos. En caso de que sea así, recomendamos repetir el ensayo utilizando una nueva muestra del animal de mejor calidad.

Almacenar el suero o plasma así obtenido entre 2 y 8°C hasta un máximo de 5 días, o en congelación para conservaciones de mayor duración.

■ CONTENIDO DEL KIT

COMPONENTE	Presentación 48 pocillos	Presentación 96 pocillos
	UNIDADES	
Pocillos de placa de microtitulación	48	96
Gotero de conjugado a la dilución de uso	1	1
Gotero de suero control positivo a la dilución de uso	1	1
Gotero de suero control negativo a la dilución de uso	1	1
Bote con solución de lavado concentrada 10x	1	1
Gotero con sustrato a la dilución de uso	1	1
Gotero con solución de frenado a la dilución de uso	1	1
Pipeta	1	1
Tips desechables	50	100
Manual de instrucciones	1	1

Los pocillos de la microplaca, se suministran en una bolsa sellada que contiene un agente desecante. Una vez utilizados los pocillos necesarios para el ensayo, introducir los pocillos no usados nuevamente en la bolsa junto con el desecante y cerrar cuidadosamente para evitar la entrada de humedad. Tras el ensayo guardar también el marco de la placa para su reutilización en sucesivos ensayos.

■ PREPARACION DE LA SOLUCION DE LAVADO

Diluir 1 parte de la solución de lavado concentrada 10x suministrada en 9 partes de agua destilada o desionizada. En ocasiones puede observarse precipitado en la solución 10x concentrada, pero esta se resolverá al mantener dicha solución a temperaturas ambiente o a 37°C durante unos 15 minutos. Puede prepararse la totalidad de la solución de lavado para posteriores aplicaciones, ya que es un reactivo que permanece estable a la dilución de uso durante periodos de 1 años, cuando se mantiene a 4°C.

■ MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse utilizando para ello bien un lavados automático de placas, bien un frasco lavador o una pipeta multicanal capaz de dispensar volúmenes de 300µl por canal.

- Tras las incubaciones, vaciar el contenido de los pocillos, volcando con brusquedad la placa.
- Sacudir la placa boca abajo sobre un papel absorbente para eliminar bien toda el contenido de los pocillos
- Llenar cada pocillo hasta el borde con solución de lavado, tratando de evitar la formación de espuma.
- Sacudir ligeramente la placa, evitando el intercambio de líquido entre pocillos.
- Vaciar el contenido de los pocillos, volcando con brusquedad la placa.
- Repetir el proceso de lavado 5 veces.
- Sacudir bien la placa boca abajo sobre papel de filtro para eliminar toda la solución de lavado.
- No dejar que los pocillos se sequen durante demasiado tiempo, mantenerlos vacíos únicamente el tiempo estrictamente necesario.

■ PROCEDIMIENTO DE REALIZACION DEL ENSAYO

Calcular el número de pocillos necesarios, teniendo en cuenta que cada vez que se haga el ensayo, deberán incluirse un pocillo para el control negativo, otro para el control positivo y un pocillo para cada muestra a analizar.

- Atemperar los pocillos a utilizar así como todos los reactivos a temperatura ambiente, durante al menos 20 minutos antes de comenzar el ensayo.

- Dispensar una gota del control positivo en el pocillo reservado para él, y dos gotas del control negativo en otro de los pocillos. Añadir 30 µl de cada muestra de suero a testar en cada uno de los restantes pocillos, utilizando para ello la pipeta suministrada en el kit, y una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- Añadir 2 gotas de conjugado en cada uno de los pocillos (incluyendo los de los sueros controles) y mezclar por agitación cuidadosamente para evitar el intercambio de reactivos entre pocillos.
- Incubar los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 5 veces los pocillos siguiendo las instrucciones recomendadas.
- Añadir 2 gotas de cromógeno a cada pocillo.
- Incubar la placa durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Valorar visualmente la aparición de reacciones colorimétricas, según se indica en el apartado interpretación de resultados.
- En caso de disponer de lector de placas y a fin de obtener un resultado objetivo de la reacción, puede procederse a la adición de solución de frenado (2 gotas en cada pocillo) y leer en el espectro a 450 nm.

■ INTERPRETACION DE RESULTADOS

Interpretacion visual:

- El pocillo del control positivo deberá presentar coloración azul, claramente diferenciable del control negativo, que debería aparecer claro.
- Las muestras positivas, desarrollaran coloración azul. La intensidad de la coloración dependerá del contenido de antígeno en la muestra.
- Las muestras negativas no desarrollaran coloración.
- Recomendamos que los pocillos sean observados sobre una superficie blanca para apreciar mejor los cambios de color.

Interpretacion mediante lectura en espectrofotómetro:

Las muestras positivas desarrollaran un valor de DO igual o superior a 0,100.

PRODUCTO DISTRIBUIDO EN ESPAÑA POR

INGENASA

Av.de la Institucion Libre de Enseñanza, 39

28037 MADRID

Tel: 91 368 0501

www.ingenasa.com



IT-73840
IT-73780



ISO 14001 ISO 9001:2015
9191.ING 9175.ING