



# CoproELISA™ Cryptosporidium

Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA)

Para la detección de antígenos de *Cryptosporidium spp.* en heces humanas

## Manual de Instrucciones

Kit para 96 determinaciones  
Número Catálogo: 734-01

Para uso diagnóstico *In Vitro*  
Sólo para uso profesional  
Almacenar a 2-8 °C. **No congelar**



**Savyon® Diagnostics Ltd.**  
3 Habosem St. Ashdod 7761003  
ISRAEL  
Tel. +972.8.8562920  
Fax: +972.8.8523176  
E-mail: support@savyondiagnosics.com

### Normas de Uso

El CoproELISA™ *Cryptosporidium* de Savyon es un Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de antígenos de *Cryptosporidium spp.* en muestras fecales humanas obtenidas de pacientes con síntomas gastrointestinales. El ensayo se puede utilizar para muestras fecales enviadas para pruebas clínicas de rutina de adultos o niños.

Para uso diagnóstico *In-Vitro*

### Introducción

La criptosporidiasis es una enfermedad diarreica autolimitada que se produce en la comunidad pero que puede ser crónica y potencialmente grave en pacientes inmunodeprimidos (1). La criptosporidiasis está causada por infección gastrointestinal con el parásito protozooario *Cryptosporidium spp.* Los síntomas de criptosporidiasis incluyen diarrea acuosa, calambres gástricos, pérdida de peso, náuseas y fiebre (2). Este parásito muy patógeno se transmite en agua contaminada y por la vía fecal-oral. Las tasas de prevalencia de criptosporidiasis en población sintomática en países desarrollados supera el 2-3% (1) y los estudios serológicos indican que la gran mayoría de la población en EEUU se ha expuesto a este patógeno. Además, este patógeno oportunista también es muy prevalente en pacientes inmunodeprimidos (p. ej., 10-40% en pacientes con VIH (3)).

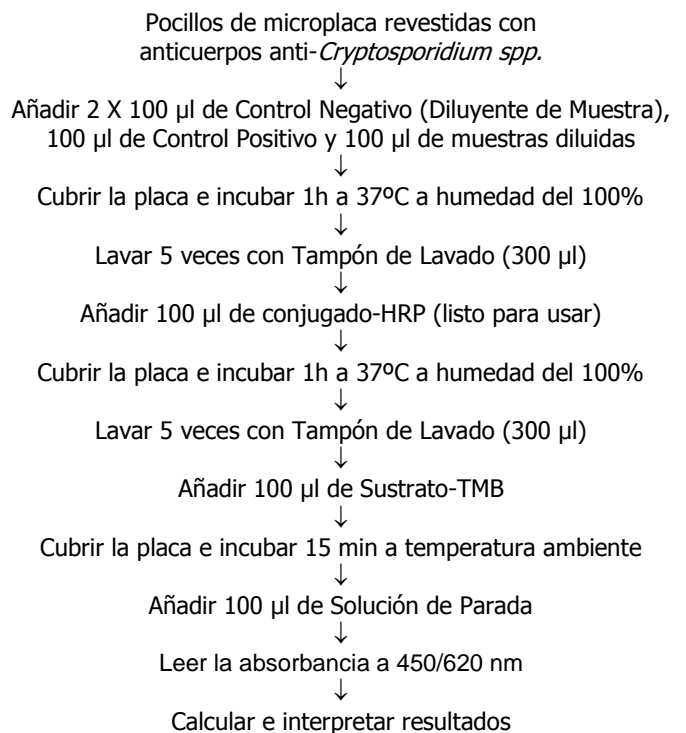
El diagnóstico de criptosporidiasis se realiza habitualmente mediante análisis microscópico de muestras de heces usando tinciones orgánicas como la tinción de Ziehl-Neelsen o ácido-alcohol resistencia, o mediante inmunotinción por anticuerpos fluorescentes directos [DFA] (4). Como la detección de

*Cryptosporidium* puede ser difícil, es posible que se pida a los pacientes que remitan varias muestras de heces a lo largo de varios días. Se dispone también de varias pruebas de EIA para la detección específica de antígenos de ovoquistes. También se han comunicado técnicas de amplificación del ADN como PCR o PCR-TI, pero estas pruebas todavía no están disponibles comercialmente. La nitazoxanida ha sido aprobada por la FDA para el tratamiento de la diarrea causada por *Cryptosporidium* en pacientes inmunocompetentes (4).

### Principio del Test

- Las placas están revestidas con anticuerpos específicos dirigidos frente a antígenos de especies de *Cryptosporidium*.
- La muestra fecal a estudiar se diluye en diluyente de muestra y se incuba con la placa pre revestida. En este paso, los antígenos de *Cryptosporidium spp.* se unen a los anticuerpos inmovilizados.
- Los antígenos no específicos se eliminan mediante lavado.
- Se añaden anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium* conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) y se incuban. En este paso, la mezcla HRP-conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo unido previamente.
- El conjugado no unido se elimina mediante lavado.
- Con la adición del sustrato TMB, el sustrato se hidroliza mediante la peroxidasa, dando una solución azul del sustrato reducido.
- Con la adición de la solución de parada, el color azul se vuelve amarillo y debe ser leído por un lector de ELISA en una longitud de onda de 450/620 nm.
- La absorbancia es proporcional al número de células de *Cryptosporidium spp.* presentes en la muestra.

### Resumen del Procedimiento Manual/Automatizado\*



### \*Procedimiento de Automatización:

- 50 minutos de incubación de muestra
- Volumen de ciclos de lavado: 500 µl/pocillo
- 10 minutos de incubación del sustrato-TMB

### Contenido del kit para uso Manual / Automatizado

#### Kit para 96 determinaciones:

1. **Microplaca revestida con anticuerpos policlonales anti-*Cryptosporidium spp.*** 96 pocillos separables (8x12) revestidos con anticuerpos policlonales anti-*Cryptosporidium spp.* envasados en bolsa de aluminio con una tarjeta desecante.  
**1 placa/1 placa**
2. **Tampón de Lavado concentrado (20x):** Tampón PBS - Tween  
**1 botella, 100 ml/1 botella, 100 ml**
3. **Diluyente de Muestra (azul):** Solución tampón lista para usar. Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante. El Diluyente también se usa como solución de control negativa (ver PROTOCOLO DEL TEST)  
**1 botella, 60 ml/2 botellas, 50 ml**
4. **Conjugado-HRP (verde):** Solución lista para usar con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con anticuerpo monoclonal anti-*Cryptosporidium spp.* Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante.  
**1 botella, 12 ml/1 botella, 16ml**
5. **Control Positivo:** Solución lista para usar que contiene antígeno de *Cryptosporidium spp.* Contiene menos del 0.05% de Proclin como conservante.  
**1 vial, 2.5 ml/1 vial, 2.5 ml**
6. **Sustrato TMB:** Solución lista para el uso que contiene 3, 3'5, 5' tetramethylbenzidina como cromógeno y peróxido como sustrato.  
**1 botella, 14 ml/1 botella, 16 ml**
7. **Solución de Parada:** Solución lista para usar. Contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>1M  
**1 botella, 15 ml/1 botella, 16 ml**
8. **Pipetas de plástico desechables:** **100 uds/no**
9. **Cubreplaca:** **1 unidad/no**
10. **Manual de Instrucciones:** **1 unidad/1 unidad**

#### Materiales Necesarios Pero No Suministrados:

1. Tubos de ensayo limpios para la dilución de las heces del paciente.
2. Micropipetas ajustables o pipetas multicanal (rangos 50-200 y 200-1000µl) y puntas desechables.
3. Recolectores desechables de plástico/madera o cucharillas.
4. Matraz volumétrico de un litro.
5. Cilindro volumétrico de 50 ml.
6. Botella de lavado.
7. Papel absorbente.
8. Agitador Vortex.
9. Baño de agua a 37°C con una tapa o una cámara de humedad colocada en un incubador a 37°C.
10. Lector de ELISA equipado con filtros de 450/620 nm.
11. Agua destilada o doblemente desionizada.
12. **Para uso automatizado:** Una centrifugadora equipada con un rotor compatible con tubos de muestra para utilizar en la máquina de automatización.

### Advertencias y Precauciones

1. El control de este kit contiene antígeno de *Cryptosporidium spp.*, que ha sido inactivado para evitar la transmisión de la infección. Sin embargo, todos los controles de este kit deben manipularse como agentes potencialmente infecciosos, de acuerdo con las recomendaciones del manual de la CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988".
2. Los reactivos deben llevarse a temperatura ambiente antes de su uso.
3. Cuando manipule los pocillos de ensayo, evite arañar el fondo de los pocillos, ya que esto puede conducir a lecturas de absorbancia elevadas.
4. Las muestras de heces, los pocillos de microensayos, las puntas de las micropipetas y los recolectores y tubos de heces desechables, deben manipularse y eliminarse como materiales potencialmente biopeligrosos después de su uso. Lleve guantes al realizar la prueba.
5. **Los pocillos sin usar se deben colocar de nuevo en la bolsa resellable con el desecante para protegerlos de la humedad.**
6. La solución de sustrato TMB es un material irritante para la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto directo.
7. El ácido sulfúrico diluido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) es un agente irritante para los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente el área con agua y consulte a un médico.

### Conservación y Estabilidad de los Reactivos

1. La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de cada componente se indican en las etiquetas individuales. El kit debe conservarse entre 2° y 8°C y debe devolverse a la nevera cuanto antes después del uso. La exposición a temperatura ambiente durante unas horas de componentes tapados o sellados originalmente, no causara daño a los reactivos. **NO CONGELAR!**
2. Las tiras no utilizadas deben volver a cerrarse en la bolsa de aluminio con la tarjeta desecante, enrollando el extremo abierto y cerrando herméticamente con cinta a lo largo de la longitud de la apertura.

### Recogida de heces

1. Son adecuados los procedimientos habituales de recogida y manipulación utilizados en cada centro para muestras fecales o cultivo.
2. **Heces conservadas:** Esta prueba es compatible con muestras que hayan sido fijadas con formol al 10% o en Formol Acetato Sódico (SAF). Las muestras conservadas se pueden almacenar a temperatura ambiente hasta 24 meses. *Esta prueba no es compatible con muestras de heces fijadas en Polivinil Alcohol (PVA).*
3. **Muestras no conservadas:** Las muestras no conservadas se deben almacenar entre 2° y 8°C y procesarse en 48 horas desde la recogida. Si no puede procesarse en 48 horas, conserve las muestras a -20°C, o menos.
4. Minimice la congelación y descongelación de la muestra ya que puede producir degradación o proteólisis de los antígenos y conducir a una pérdida de actividad.

### Protocolo del test para uso manual

#### A. Preparación de los Reactivos

1. Lleve a temperatura ambiente todos los componentes y muestras clínicas a estudiar. Determine el número total de muestras a estudiar. Además de las muestras, debe

incluirse lo siguiente en cada prueba: dos pocillos de Control Negativo (Utilice Diluyente de Muestra para este fin) y un pocillo de Control Positivo.

2. Extraiga la microplaca de su bolsa de aluminio cortando un extremo cerca del sello. Deje el número necesario de tiras (de acuerdo con el número de muestras a estudiar) en el marco de 96 pocillos.
3. Diluya el Tampón de Lavado Concentrado 1/20 con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de tampón de lavado, añada 50 ml de Tampón de Lavado Concentrado a 950 ml de agua destilada o doblemente desionizada.

#### B. Preparación de la muestra

4. Prepare un tubo de dilución para cada muestra a analizar. Se recomiendan tubos Eppendorf de 1.5 ml para este fin. Añada 400 µl de Diluyente de Muestra a cada tubo. Etiquete el tubo.
5. **Muestras formadas:** Utilice un aplicador de madera o una cucharilla desechable para transferir la muestra fecal al tubo. Transfiera aproximadamente 0.1 a 0.15 g de muestra (aproximadamente el tamaño de un guisante pequeño) al Diluyente de Muestra. Mezcle el recolector en el *Diluyente de Muestra* para eliminar la mayor cantidad de muestra posible y apriete el recolector contra el lateral del tubo para expresar cualquier líquido residual.  
**Muestras líquidas:** transfiera 150 µl de muestra al tubo. Asegúrese de que las muestras líquidas se suspenden de forma uniforme.
6. **Mezcle concienzudamente (vortex) la muestra fecal para asegurar una toma de muestra adecuada.**
7. Deje reposar el tubo durante al menos 10 minutos, pero no más de 30 minutos, hasta que las partículas grandes precipiten (decantación). Utilice el sobrenadante para la prueba. NO UTILICE CENTRIFUGA PARA ESTE FIN

#### C. Incubación de muestras de heces y controles

8. Dispense 100 µl de Control Positivo y 2X100µl (duplicado) de Control Negativo (por ej, Diluyente de Muestra) en distintos pocillos de la tira de prueba.
9. Dispense 100 µl de muestras de heces diluidas en distintos pocillos de la tira de prueba usando las pipetas desechables suministradas (la marca inferior de la pipeta).
10. Cubra las tiras con un cubreplacas e incube durante 1 hora a 37°C en una cámara de humedad.
11. **Paso de lavado:** Deseche el contenido líquido de los pocillos. Llene cada pocillo con Tampón de Lavado hasta la parte superior del pocillo (300 µl). Repita este paso 4 veces hasta un total de **CINCO** veces. Se puede utilizar una máquina automática de lavado.
12. Seque las tiras y el marco golpeándolas suavemente sobre un papel absorbente limpio.

#### D. Incubación con Conjugado

13. Dispense 100µl de conjugado listo para usar en cada pocillo.
14. Cubra las tiras con un cubreplacas e incube durante 1 hora a 37°C en una cámara de humedad.
15. Deseche el contenido líquido y lave **CINCO** veces como se describe en los pasos 11-12.

#### E. Incubación con Sustrato TMB

16. Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo, cubra las tiras con un cubreplacas, e incube a temperatura ambiente durante **15 minutos**.

17. Detenga la reacción añadiendo 100µl de Solución de Parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) en cada pocillo.

#### F. Determinación de Resultados

18. Determine la absorbancia a 450/620 nm y registre los resultados. La determinación no debe exceder los 10 minutos tras la detención de la reacción cromogénica.

**Nota:** Todas las burbujas de aire deben eliminarse antes de la lectura. El fondo de la placa ELISA debe limpiarse cuidadosamente.

---

### Protocolo de la prueba para uso automatizado

#### A. Preparación de los Reactivos

1. Lleve a temperatura ambiente todos los componentes y muestras clínicas a estudiar. Determine el número total de muestras a estudiar. Además de las muestras, debe incluirse lo siguiente en cada prueba: un pocillo de Control Negativo (Utilice Diluyente de Muestra para este fin) y un pocillo de Control Positivo.
2. Extraiga la microplaca de su bolsa de aluminio cortando un extremo cerca del sello. Deje el número necesario de tiras (de acuerdo con el número de muestras a estudiar) en el marco de 96 pocillos.
3. Diluya el Tampón de Lavado Concentrado 1/20 con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de tampón de lavado, añada 50 ml de Tampón de Lavado Concentrado a 950 ml de agua destilada o doblemente desionizada.

#### B. Preparación de la muestra

4. Prepare un tubo de dilución para cada muestra a analizar (utilice tubos de muestra compatible con el equipo automatizado disponible). Añada 800 µl de Diluyente de Muestra a cada tubo. Etiquete el tubo.
5. **Muestras formadas:** Utilice un aplicador de madera o una cucharilla desechable para transferir la muestra fecal a el tubo. Transfiera aproximadamente 0.2 a 0.3 g de muestra (aproximadamente del tamaño de 2 pequeños guisantes) al tubo de muestra. Mezcle el recolector en el *Diluyente de Muestra* para eliminar la mayor cantidad de muestra posible y apriete el recolector contra el lateral del tubo para expresar cualquier líquido residual.  
**Muestras líquidas:** transfiera 300 µl de muestra al tubo. Asegúrese de que las muestras líquidas se suspenden de forma uniforme.
6. **Mezcle concienzudamente (vortex) la muestra fecal para asegurar una toma muestra adecuada.**
7. Deje el tubo reposar durante al menos 10 minutos. Centrifugue los tubos a 1000 g durante 30 seg. Asegúrese de que el sobrenadante formado no contiene partículas grandes.
8. Transfiera los tubos de muestra a la correspondiente gradilla en el instrumento automatizado.

#### C. Incubación de las muestras de heces y controles

9. Dispense 100 µl de Control Positivo y 2X100µl (duplicado) de Control Negativo (por ej, Diluyente de Muestra) en distintos pocillos de la tira de prueba
10. Dispense 100 µl de muestras de heces diluidas en distintos pocillos de la tira de prueba.
11. Incube la placa a 37°C durante **50 minutos**.
12. Realice 5 ciclos de lavado de **500µl** usando el tampón de lavado prediluido.
13. Realice 2 ciclos de aspiración con aspirado de barrido.

#### D. Incubación con Conjugado

- Dispense 100µl de conjugado listo para usar en cada pocillo.
- Incuba durante **1h** a 37°C.
- Repita los ciclos de lavado como se describe en los pasos 12-13.

#### E. Incubación con Sustrato TMB

- Dispense 100 µl de sustrato TMB en cada pocillo. Incube a temperatura ambiente durante **10 minutos**.
- Detenga la reacción añadiendo 100µl de Solución de Parada (H2SO4 1M) en cada pocillo.

#### F. Determinación de Resultados

- Determine la absorbancia a 450/620 nm y registre los resultados.

**Por favor, tenga en cuenta que cada máquina automatizada tiene comandos técnicos específicos. Por favor, implemente el procedimiento de automatización de Savyon para este kit en el protocolo de operación de su equipo automatizado.**

#### Validación de la Prueba

Para que la prueba sea válida se deben cumplir los siguientes criterios. Si estos criterios no se cumplen, la prueba debe considerarse no válida y debe repetirse.

- Control Positivo:** El valor de absorbancia debe ser  $\geq 1.0$  a 450/620 nm.
- Control Negativo:** El valor de absorbancia debe ser  $\leq 0.25$  a 450/620 nm.

#### Determinación del Valor de Corte

Se debe calcular la media del valor de absorbancia de Control Negativo procesado en duplicado

El valor de corte (COV) se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{COV} = \text{OD control negativo}_{450/620} + 0.3$$

#### Interpretación de Resultados

Absorbancia (450/620nm)	Resultados
O.D < COV	<b>Negativo:</b> antígeno de <i>Cryptosporidium</i> no detectable
O.D $\geq$ COV	<b>Positivo:</b> niveles relevantes de antígeno de <i>Cryptosporidium</i>

#### Limitaciones del Procedimiento

- El test no es compatible con muestras de heces fijadas en Polivinil Alcohol (PVA).
- La conservación de las muestras en solución de formol/SAF (realizada en la consulta del médico) debe dar una mezcla que contenga hasta una proporción de 1:5 (p:v) de heces en solución conservante.
- Un resultado positivo no excluye la presencia de otras etiologías. Por lo tanto, se aconseja tener en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio antes de hacer el diagnóstico final y decidir sobre el manejo adecuado del paciente.

#### Características Funcionales del Test

En un estudio independiente realizado en un Laboratorio de referencia en EEUU, se estudió un total de 120 muestras de

heces fijadas en formol, SAF o totales, mediante el test CoproELISA™ *Cryptosporidium*. La presencia de parásitos gastrointestinales en estas muestras se determinó mediante examen microscópico. Los resultados de esta evaluación muestran en la tabla 1:

Tabla 1.

CoproELISA™ <i>Cryptosporidium</i>	Microscopio	
	Positivo	Negativo
Positivo	60	0
Negativo	0	60

Sensibilidad: 100%      Especificidad: 100%  
VPP: 100%              VPN: 100%

Se realizó un estudio adicional en EEUU. El test CoproELISA™ *Cryptosporidium* fue comparado con un test ELISA comercial aprobado por la FDA. Se encontró una concordancia del 100% entre los dos kits (Datos no mostrados).

#### Reactividad cruzada e interferencia por infecciones mixtas

El test CoproELISA™ *Cryptosporidium* test fue evaluado utilizando muestras de heces definidas como positivas para diferentes patógenos gastrointestinales. No se observó reactividad cruzada o interferencia por infección mixta con ningún patógeno de la siguiente lista:

*E. histolytica*, *E. dispar*, *E. hartmanni*, *Blastocystis spp.*, *G. lamblia*, *D. fragilis*, *E. coli*, *E. nana* and *I. butschlii*. *Ascaris*, *Hookworm*, *T. trichiura*, *C. cayetanensis*. Del mismo modo, no se observe interferencia por leucocitos.

#### Precisión

Tabla 2: La precisión intra-ensayo (dentro de una ejecución) del test CoproELISA™ *Cryptosporidium* se muestra a continuación:

Muestra	No. of Replicados	Valor Medio	CV%
Positivo	8	1.48	4.02
Negativo	8	0.03	5.99

Tabla 3: La precisión inter-ensayo (entre distintas ejecuciones) del test CoproELISA™ *Cryptosporidium* se muestra a continuación:

Muestra	No. of Replicados	Valor Medio	CV%
Positivo	8	1.47	7.7
Negativo	8	0.025	15.6

#### Bibliografía

- Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. Curr Opin Infect Dis. 15(5):523-7 (2002) Tzipori S. and Widmer G.
- A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. Trends Parasitol. 24(4): 184-9. (2008)
- Martins C. & Guerrant R.L. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Parasitology Today, 5. 4 (1995)
- Cryptosporidiosis. (CDC fact sheet), Centers for Disease Control and Prevention. 2009-02-05. <http://www.cdc.gov/crypto/> (2009)

CE



Representante Europeo Autorizado: Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BELGIUM

Tel: +(32) 2. 732.59.54

Fax: +(32) 2.732.60.03

E-Mail : [mail@obelis.net](mailto:mail@obelis.net)

	Límite de Temperatura
	Consular las instrucciones de uso
	Dispositivo para diagnóstico médico <i>In Vitro</i>
	Fabricante
	Representante Europeo Autorizado