

CYSTICERCOSIS



Western Blot IgG

Prueba de inmunotransferencia de diagnóstico *in vitro*
Técnica semiautomática / manual

#CYS-WB24G : 24 pruebas

#CYS-WB12G : 12 pruebas

#CYS-WB96G : 96 pruebas

INSTRUCCIONES DE USO

Encuentre más información e instrucciones de uso en su idioma en nuestro sitio web
www.ldbiodiagnostics.com

USO PREVISTO

CYSTICERCOSIS Western Blot (WB) IgG se trata de un solo uso análisis cualitativo de diagnóstico serológico de IgG mediante una prueba de inmunotransferencia de cisticercosis previsto para las pruebas confirmatorias de un resultado positivo o ambiguo obtenido por medio de pruebas diagnósticas clásicas. Puede realizarse en suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Técnica Western Blot

Los antígenos (extracto de cisticercos de *Taenia solium* de origen porcino), una vez separados mediante electroforesis, se unen mediante electrotransferencia a la superficie de una membrana de nitrocelulosa (llamada de transferencia), que se corta en 24 tiras numeradas del 1 al 24.

Desarrollo de la prueba

Cada muestra de suero (o LCR) del ensayo se incuba por separado con una tira. Los anticuerpos potencialmente presentes en la muestra, se unen de forma selectiva a los antígenos. El conjugado de fosfatasa alcalina con IgG antihumana se une posteriormente a los anticuerpos unidos. Finalmente, los inmunocomplejos reaccionan al sustrato. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos de tipo IgG presentes en las muestras aparecen como bandas transversales de color púrpura.

REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL KIT

Por defecto: Caja con 24 pruebas (#CYS-WB24G)

cursiva: caja con 12 pruebas (#CYS-WB12G) - **negrita:** Caja con 96 pruebas (#CYS-WB96G).

ID	Cantidad	Descripción	Composición
R1	1	Carpeta(s) con 24 (12, 4x24) TIRAS: precortadas + estándares de color. (Cada carpeta y cada transferencia se identifica mediante un número de serie único)	Nitrocelulosa sensibilizada. Peso molecular codificado por colores (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15, Amarillo: 10.
R2	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de AMORTIGUADOR DE MUESTRAS (Listo para su uso - solución rosada).	Amortiguador + tensioactivo + NaN ₃ (<0,1%).
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 2x60) ml de CONJUGADO ANTI IgG (Listo para su uso - solución azul).	Amortiguador + sueros policlonales de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina + NaN ₃ (<0,1%) + estabilizadores.
R5	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de SUSTRATO (Listo para su uso - frasco marrón opaco).	Amortiguador + nitroazul de tetrazolio (NBT) + 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) + estabilizadores.
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) ml de AMORTIGUADOR DE LAVADO CONCENTRADO 10X (Para diluir 10 veces en agua destilada - solución incolora).	Amortiguador + tensioactivo + NaN ₃ (<0,1%).
R10	1	Tubo de 200 (200, 2x200) µl de SUERO de CONTROL POSITIVO (Listo para su uso - tapón rojo).	Amortiguador + mezcla de suero humano positivo en serología para cisticercosis + NaN ₃ (<0,1%) + estabilizadores.

R2, R3, R5 y R6 son los mismos para todos los kits y tienen un número de lote único dependiendo solo de su fecha de producción. **Se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunotransferencia de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.**

El **R10** está calibrado en inmunotransferencia de acuerdo con un lote de referencia y solo está dedicado a esta técnica.

R3, R6, R10 (NaN₃): EUH 032 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

EUH 210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad, así como en nuestro sitio web www.ldbiodiagnostics.com.

SE REQUIERE MATERIAL ADICIONAL NO SUMINISTRADO

- Bandejas de incubación de polipropileno multicanal para mini transferencias (#WBPP-08 o equivalente).
- Plataforma giratoria para inmunotransferencias, sistema de vacío para líquidos (los tubos #WBPP-08 que suministramos pueden vaciarse con un simple giro).
- Tubos y material para la extracción de muestras, cilindros graduados.
Pipetas automáticas, micropipetas y puntas desechables (volúmenes de 25 µl, 1,2 ml y 2 ml).
- Agua destilada o desionizada. Papel absorbente (p. ej., papel de filtro Whatman), cinta adhesiva transparente.
- Guantes, pinzas para manipular las tiras, cuchilla o bisturí y regla plana transparente.

Nota: nuestros reactivos pueden utilizarse en un procesador automático de inmunotransferencia. **Se debe prestar atención a los contaminantes químicos de nuestros reactivos en caso de que el procesador sea compartido con reactivos de otro fabricante** (un ejemplo conocido: contaminación por el TWEEN 20) y contaminaciones bacterianas. Frascos de reserva para el procesador. Después del procesamiento, no vuelva a colocar los reactivos usados restantes en los frascos originales.

ALMACENAMIENTO

Almacenar a una temperatura entre 2 y 8°C. Los reactivos del Kit permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja exterior y las etiquetas de los frascos. No use reactivo contaminado o turbio. El amortiguador de lavado diluido al 1/10 permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre +2 y +8 C y una semana a temperatura ambiente.

PRECAUCIONES DE USO

Seguridad

- Solo para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional. Solo para personal capacitado técnicamente. Manipule conforme a la buena práctica de laboratorio y tenga en cuenta cualquier reactivo y cualquier muestra como potencialmente tóxicos y/o infecciosos.
- Haga uso de una bata de laboratorio, guantes y gafas; no beba, coma ni fume en el laboratorio. No introduzca las pipetas en la boca.
- El control positivo es un suero de origen humano que ha sido inactivado para los virus VIH 1 y 2, hepatitis B y hepatitis C. No obstante, debe manipularse como si fuera un producto potencialmente infeccioso.
- El sustrato contiene una mezcla de NBT y BCIP, tóxica al contacto (con la piel y las membranas mucosas) y por inhalación.
- Los reactivos contienen azida sódica, que puede formar sales metálicas explosivas con el plomo y el cobre. Enjuague las salpicaduras con agua.
- Elimine los residuos (muestras, puntas, tubos, líquido de lavado, reactivo usado...) de acuerdo con las buenas prácticas empleadas en la industria y la normativa vigente del país.
- Cualquier incidente grave debe ser objeto de una declaración al fabricante y a la autoridad competente.

Precauciones

- Lea e interprete los resultados bajo luz blanca directa.
- No utilice los reactivos líquidos procedentes de lotes diferentes simultáneamente.
- Utilice las tiras en orden numérico. No mezcle las tiras procedentes de cajas con números de serie diferentes; utilice las transferencias consecutivamente. Establezca un plan de distribución específico antes de comenzar la prueba.
- No toque las tiras con los dedos; utilice pinzas.
- Los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso, especialmente el amortiguador de lavado concentrado.
- Cierre los frascos después de cada uso; no se deben utilizar si se introdujera accidentalmente una sustancia en los reactivos. No utilice el reactivo de un frasco que presente indicios de fuga. No utilice soluciones turbias o precipitadas.
- Utilice solo puntas de pipetas desechables. Evite cualquier contaminación entre los canales. Vigile la formación de espuma o burbujas en las puntas de las pipetas (contaminación bacteriana de los frascos de reactivos).
- Limpie las bandejas de incubación solo con agua limpia y seguidamente con agua destilada (no utilice nunca detergente ni lejía).
- La omisión de una muestra o la distribución de un volumen inadecuado pueden dar lugar a un resultado negativo o positivo de la prueba, independientemente de su situación real.

RECOGIDA DE ESPECIMENES

Recoja las muestras en tubos secos de forma aséptica. Se requiere una cantidad mínima de suero de 25 µl o LCR. En los casos de LCR, el uso de 50 µl aumentará la sensibilidad de la prueba.

Mantenga las muestras a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento. Congele las muestras a una temperatura de -20 ± 5 °C si precisan almacenamiento durante más de una semana. No utilice la muestra que esté contaminada. Evite la congelación y descongelación repetidamente de las muestras.

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictericos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados a partir del uso cauteloso de dichas muestras.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Amortiguador de lavado: para 4 pruebas, en un frasco limpio, diluya 10 ml de concentrado de lavado 10X (**R6**) en 90 ml de agua destilada o desionizada. Tenga cuidado de mezclar bien el tampón diluido.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Nota Bene: se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunotransferencia de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.

1. Prepare un plan de distribución para las muestras y un control positivo C+ (**R10**).

Solo mediante el uso de este control será posible validar la prueba técnicamente y llevar a cabo la identificación, para un número de serie determinado de las bandas específicas desarrolladas. No puede utilizarse una tira C+ para interpretar los resultados de las tiras de una transferencia con un número de serie diferente.

2. Corte el número de tiras necesario (R1) con un bisturí y una regla plana transparente limpia, manteniendo la línea azul de posición en las tiras: sujete las tiras con firmeza de acuerdo con la posición de la regla y córtelas por el lado donde se está haciendo presión (los números son visibles a través de la regla).
3. Distribuya 1,2 ml de amortiguador de muestras (R2) en cada canal de acuerdo con el plan establecido.
4. Deposite, por orden numérico, las tiras numeradas en los canales: deje que las tiras se rehidraten en la superficie del amortiguador durante aproximadamente 2 minutos, con el número visible en la parte superior, LUEGO agitando suavemente la bandeja para sumergirlas completamente en el amortiguador.
5. Distribuya las muestras y los controles positivos: de acuerdo con el plan de distribución, a razón de 25 µl por canal (preferentemente 50 µl para LCR). Agite suavemente la bandeja después de cada dispensación. Coloque la bandeja en una plataforma oscilante a temperatura ambiente.
 - Suero: **Incube durante 90 min ± 5 min** a temperatura entre 20 y 26 °C.
 - LCR: **Incube durante la noche (16 horas +/- 2 horas)** a 20 y 26 °C. Debe cubrir la bandeja de incubación con aluminio para evitar que se seque.
6. Fase de lavado: vacie el contenido de los canales con una pipeta Pasteur o girando la bandeja de incubación. Distribuya entre 2 y 3 ml de amortiguador de lavado diluido en cada canal. Incube en la plataforma giratoria durante 3 min. Repita 2 veces la operación, después vacie el contenido de los canales. Asegúrese de que las tiras no se giran durante estas fases.
7. Distribuya 1,2 ml de conjugado anti-IgG (R3) en cada canal. Coloque la bandeja en la plataforma giratoria. **Incube durante 60 min ± 5 min** a una temperatura entre 20 y 26 °C.
8. Fase de lavado: repita el paso 6.
9. Distribuya 1,2 ml de sustrato NBT/BCIP (R5) en cada uno de los canales. Coloque en la plataforma giratoria y proteja de la luz directa. **Incube durante 60 min ± 5 min** a una temperatura entre 20 y 26 °C.

Independientemente de cuál sea el parámetro, supervise la variación del color. La variación se puede interrumpir si se oscurece el color de fondo de la tira hasta llegar a un punto en que la lectura sea difícil (la calidad de las fases de lavado influye directamente en la coloración de fondo). Es preciso tener en cuenta que las tiras tienden a aclararse a medida que se secan.

10. Interrumpa la reacción mediante la aspiración de sustrato con una pipeta Pasteur o girando el cubo de incubación y distribuyendo 2 ml de agua destilada en los canales. Repita una vez más esta última fase de lavado.
11. Secado de las tiras: con los canales todavía llenos de agua, sujete las tiras por el extremo numerado con las pinzas y deposítelas en el papel absorbente Whatman con el número visible. Deje secar al aire. El color de las tiras se aclarará de forma natural al secarse. La interpretación de la prueba solo debe realizarse una vez finalizado el secado.
12. Almacenamiento: transfiera las tiras a una hoja de papel, que se utilizará para archivarlas. Alinee las líneas de posición. Manténgalas de acuerdo con la posición de la regla plana, pegue la parte superior de las tiras con cinta adhesiva transparente.

Para una interpretación acertada, las tiras deben ordenarse por transferencia y por orden numérico y debe haber un espacio de separación máximo entre ellas de varios milímetros. No es fiable comparar las tiras que están muy separadas (p. ej., la n.º 2 con la n.º 15). **Es arriesgado** (resultados falsos) comparar las tiras de kits diferentes (tiras con números de serie diferentes).

CONTROL DE CALIDAD E INTERPRETACION

El control de suero (R10) suministrado con el kit debe incluirse sistemáticamente en las series de inmunotransferencia. Muestra el perfil típico y permite la validación técnica del desarrollo satisfactorio de la prueba (las bandas deben ser claramente visibles en la tira) y calibrar con precisión la posición y el aspecto de las bandas específicas para permitir la interpretación de los resultados de las tiras de la misma transferencia (con el mismo número de serie).

Nota Bene: El perfil del control positivo (R10) puede variar según el número de lote de los reactivos utilizados. Las imágenes correspondientes están disponibles en nuestro sitio web www.ldbiodiagnostics.com como ejemplo.

Descripción de las bandas

Una muestra positiva puede presentar numerosas bandas con un peso molecular de entre 2 y 200 kilodaltons (kDa). En la práctica y por motivos de especificidad, para la lectura solo se conserva la zona de 6 a 55 kDa.

En esta zona, existen cinco bandas con una mayor presencia en los pesos moleculares siguientes (kDa) **6-8, 12, 23-26, 39, 50-55**. Motivo por el cual reciben las denominaciones siguientes: **P6-8, P12, P23-26, P39 y P50-55**.

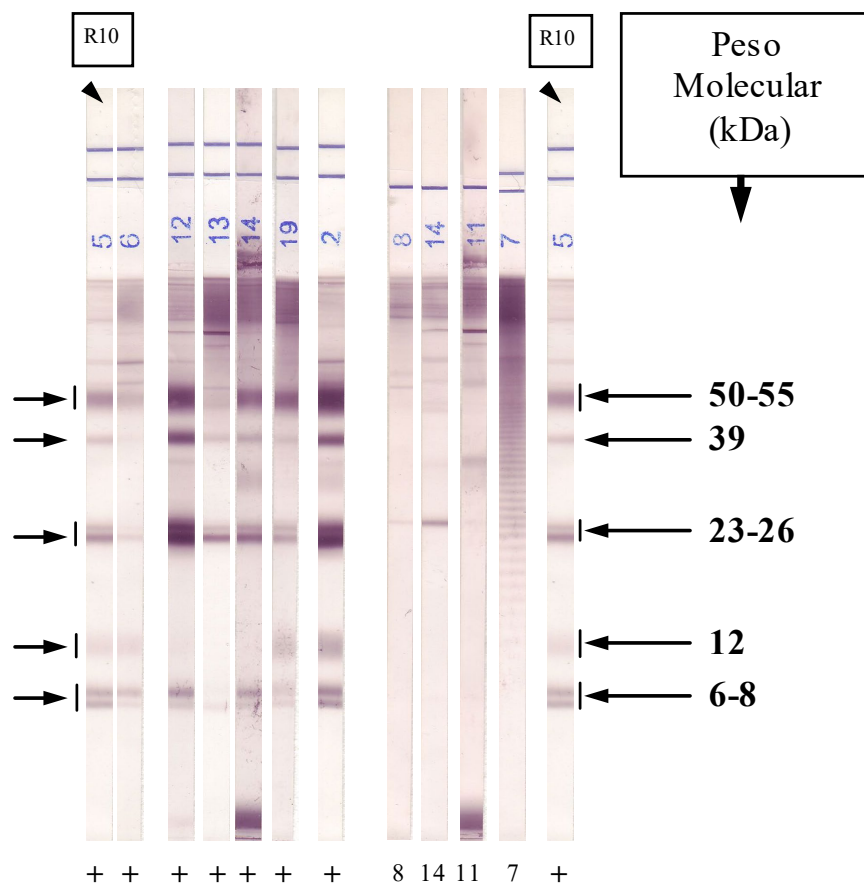


Fig. 1: ejemplos de resultados positivos y negativos

Aspecto de las bandas

Las bandas **P6-8** y **P23-26** pueden adoptar la forma de una única banda ancha o de una banda doble. La banda **P50-55** suele presentarse en forma de una banda ancha de contorno bastante difuso.

Notas importantes - **En la práctica** (véase la **fig. 1**):

Las zonas 6-26 kDa y 39-55 kDa son las más específicas, las que se pueden leer e interpretar con mayor facilidad.

La zona intermedia, delimitada por las bandas P23-26 y P39, no es totalmente específica de la cisticercosis (reacciones cruzadas frecuentes especialmente con otras helmintiasis y el paludismo *P. falciparum*).

Interpretación

La presencia de como mínimo **dos bandas bien definidas** entre las cinco descritas anteriormente, P6-8, P12, P23-26, P39 y P50-55, indica la existencia de cisticercosis en el suero y neurocisticercosis en el LCR.

Ejemplos anteriores: «+» = neurocisticercosis - 8, 14, 11 = hidatidosis 7 = equinococosis alveolar.

Nota: La tira siete presenta el aspecto no específico de "Mikado" (§ *Solución de problemas*).

Para validar los resultados, se debe comparar siempre el perfil de la inmunotransferencia de cada muestra con la del control positivo (R10). El aspecto de las bandas es importante a la hora de interpretar la prueba.

LIMITACIONES DE USO

- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se puede establecer sobre la base de un solo resultado de prueba.
- Estos resultados serológicos deben interpretarse de acuerdo con la información disponible (por ejemplo epidemiológica, clínica, imagenológica, biológica, etc.) para poder establecer un diagnóstico. No deben utilizarse como base para el diagnóstico basándose únicamente en su positividad.

PERFORMANCE (ver referencias bibliográficas)

Sensibilidad (Se)

La evaluación se refiere a 79 muestras (70 sueros y 9 LCR) positivas según criterios clínicos, epidemiológicos, radiológicos y/o serológicos.

77 muestras de los 9 LCR han arrojado resultados positivos. **Sensibilidad Se = 97,5 %**

Especificidad (Sp)

La evaluación se refiere a 95 muestras, incluidos 81 sueros de pacientes que padecen las infecciones parasitarias siguientes: *Toxocara canis* (7), *Trichinella spiralis* (14), *Toxoplasma gondii* (7), Filarioses (7), *Fasciola hepatica* (4), *Echinococcus granulosus* (14), *E. multilocularis* (14), *Schistosoma* sp. (14) y 14 sueros de pacientes que padecen enfermedades autoinmunitarias: Factor reumatoide RF+ (7) y anticuerpos antinucleares ANA+ (7).

Todos los resultados han sido negativos. **Especificidad Sp = 100 %**

Nota: algunas muestras presentan bandas aisladas, finas, que no se deben confundir con las bandas específicas (véanse los ejemplos **Fig. 1**). En concreto, el aspecto característico (ancho y difuso) de la banda **P50-55** permite diferenciarla de las bandas finas que en ocasiones se localizan a este nivel con los sueros de equinococosis, hidatidosis o esquistosomiasis.

Conclusión

La correlación entre la cisticercosis de WB y el estado clínico es excelente.

Sensibilidad Se = 97.5% [IC95: 90.3 - 99.6%]

Especificidad Sp = 100% [IC95: 95.1 - 100%]

Los intervalos de confianza se calculan según el método de Wilson con corrección de continuidad.

Reproducibilidad

Se analizó la reproducibilidad entre series y entre lotes. En ambos casos, la correlación entre los sueros con respecto a las bandas específicas es excelente.

Interferencia

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictéricos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados a partir del uso cauteloso de dichas muestras.

SOLUCION DE PROBLEMAS

"Las bandas son pálidas con poco contraste": Algunos sueros con concentraciones bajas de anticuerpos pueden aportar

esos resultados.

"Pueden apreciarse áreas sombreadas, más o menos coloreadas y ligeramente difusas": La banda no se sumergió totalmente en uno de los reactivos y no incubó correctamente en toda su longitud. Puede asimismo haber presencia de manchas donde se depositó la muestra si no se sacudió la bandeja después de la dispensación.

"El ruido de fondo es considerable, lo que dificulta la lectura": Los lavados fueron insuficientes o la última incubación fue demasiado larga. Asegure unas buenas técnicas de ejecución de las pruebas, respete los tiempos de lavado y la calidad del agua. Reduzca el tiempo de la última incubación. Excepcionalmente, algunos sueros pueden reaccionar de manera no específica. Entonces, no es posible utilizar el resultado de la inmunotransferencia. Este ruido de fondo no específico puede comprometer solo parte de la tira, arrojando resultados no interpretables para esa parte únicamente.

"Aparece un precipitado en la solución durante la última fase de desarrollo": Puede haberse precipitado el sustrato (escamas negras) en el amortiguador al final del desarrollo. Este fenómeno no altera la calidad del desarrollo, el cual debe continuarse normalmente. El último lavado con agua destilada elimina las posibles partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFIA

- Deckers, Nynke, et Pierre Dorny. « Immunodiagnosis of Taenia Solium Taeniosis/cysticercosis ». *Trends in Parasitology* 26, n° 3 (mars 2010): 137-44. doi:10.1016/j.pt.2009.12.008.
- Del Brutto, Oscar H. « Diagnostic Criteria for Neurocysticercosis, Revisited ». *Pathogens and Global Health* 106, n° 5 (septembre 2012): 299-304. doi:10.1179/2047773212Y.0000000025.
- Dournon, Nathalie, Loic Epelboin, Marie-Charlotte Brion, Luc Paris, François Bricaire, et Eric Caumes. « Seroconversion of Neurocysticercosis Occurring After Anti-Helminthic Treatment: Neurocysticercosis With Seroconversion ». *Journal of Travel Medicine* 19, n° 6 (octobre 2012): 383-86. doi:10.1111/j.1708-8305.2012.00658.x.
- Garcia, Hector H, Theodore E Nash, et Oscar H Del Brutto. « Clinical Symptoms, Diagnosis, and Treatment of Neurocysticercosis ». *The Lancet Neurology* 13, n° 12 (décembre 2014): 1202-15. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
- Gekeler, F, S Eichenlaub, E G Mendoza, J Sotelo, M Hoelscher, et T Löscher. « Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 21, n° 3 (mars 2002): 227-29. doi:10.1007/s10096-002-0695-3.
- Michelet, Lorraine, Agnès Fleury, Edda Sciutto, Eric Kendjo, Gladis Fragoso, Luc Paris, et Bernard Bouteille. « Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid ». *Journal of clinical microbiology* 49, n° 1 (janvier 2011): 195-200. doi:10.1128/JCM.01554-10.
- Raccurt, C P, P Agnamey, J Boncy, J-H Henrys, et A Totet. « Seroprevalence of human Taenia solium cysticercosis in Haiti ». *Journal of helminthology* 83, n° 2 (juin 2009): 113-16. doi:10.1017/S0022149X09232330.
- Rodriguez, Silvia, Patricia Wilkins, et Pierre Dorny. « Immunological and Molecular Diagnosis of Cysticercosis ». *Pathogens and Global Health* 106, n° 5 (septembre 2012): 286-98. doi:10.1179/2047773212Y.0000000048.
- šObla, Barbara, Bojana Beović, Zala Lužnik, Miha Skvarč, et Jernej Logar. « Evidence of Human Neurocysticercosis in Slovenia ». *Parasitology* 141, n° 04 (avril 2014): 547-53. doi:10.1017/S0031182013001947.
- Van Doorn, H. Rogier, Ellen Wentink-Bonnema, Rob J. Rentenaar, et Tom van Gool. « Specific Cross-Reactivity in Sera from Cystic Echinococcosis Patients in an Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot for Cysticercosis Diagnostics ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, n° 9 (septembre 2007): 948-50. doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.021.

Notificación de actualización: lea atentamente

FECHA DE LANZAMIENTO	VERSION	RESUMEN DE MODIFICACIONES
31/07/2020	Vs 18	Diseño - Reactivos suministrados - Precauciones de uso - Estabilidad - Recogida de muestras - Procedimiento de prueba - Control de calidad e interpretación
06/08/2021	Vs 19	Eliminación de la advertencia de seguridad R5 - Tiempo de incubación nocturno - Dirección de correo electrónico de contacto – NaN3 EUH032



NF EN ISO 13485

19A rue Louis Loucheur – 69009 LYON – FRANCE
Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com