

TRICHINELLA ES



Western Blot IgG

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

#TRI ES-WB24G: 24 pruebas

#TRI ES-WB12G: 12 pruebas

#TRI ES-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

TRICHINELLA ES Western Blot (WB) IgG se trata de un solo uso análisis cualitativo de diagnóstico serológico de IgG mediante una prueba de inmunotransferencia de la triquinelosis previsto para las pruebas confirmatorias de un resultado positivo o ambiguo obtenido por medio de pruebas diagnósticas clásicas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Técnica Western Blot

Los antígenos excretados/secretados (ES) de *Trichinella spiralis*, 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 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

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

Cursiva: caja con 12 pruebas (#TRI ES-WB12G) - **negrita:** Caja con 96 pruebas (#TRI ES-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.
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 + NaN3 (<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 + NaN3 (<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 <i>Trichinella</i> + NaN3 (<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.**

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 Y ESTABILIDAD

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.

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. Agite suavemente la bandeja después de cada dispensación. Coloque la bandeja en una plataforma giratoria.
Incube durante 90 minutos ± 5 minutos a temperatura entre 20 y 26 °C.
6. Fase de lavado: vacíe 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 minutos. Repita 2 veces la operación, después vacíe 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 minutos ± 5 minutos 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 minutos ± 5 minutos 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 presenta bandas con un peso molecular de entre 37 y 140 kDa. En la práctica y por motivos de simplicidad, para la lectura solo se conserva la zona de peso molecular reducido (de 37 a 50 kDa). Sistemáticamente aparecen 3 bandas en 37, 41 y 50 kDa. Es por ello que reciben las denominaciones siguientes: **P37, P41 y P50**. Las bandas P37 y P41 son las más intensas. La banda P50 suele ser más pálida

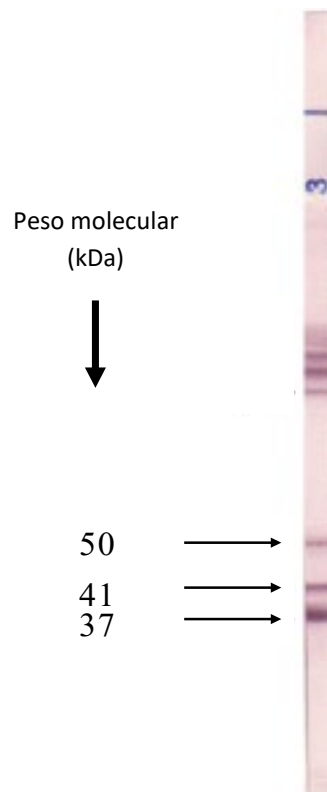


Fig. 1: Ejemplos de resultados positivos

Interpretación

La presencia **simultánea** de las tres bandas **P37, P41 y P50** indica la existencia de triquinelosis.

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.

REALIZACION (ver referencias bibliográficas)

La evaluación de los resultados del estuche **TRICHINELLA ES WB IgG** (antígeno *T. spiralis ES*) ha sido llevada a cabo por un laboratorio independiente en comparación con la versión anterior del kit LDBIO Diagnostics (TRICHINELLA WB IgG - **antígeno total**) designado a continuación: WB DE REFERENCIA comercializado desde 2001.

Sensibilidad (Se)

La muestra estudiada corresponde a 80 sueros de pacientes que padecen triquinosis clínica.

Sensibilidad del WB de referencia = 98,8 %

Sensibilidad de **TRICHINELLA ES WB IgG = 97,5 %**

Especificidad (Sp)

Se ha analizado a partir de 165 sueros de pacientes que presentan helmintosis que podrían sufrir reacciones cruzadas: *Toxocara* (34), *Schistosoma* (34), filariasis (5), equinococosis (17), distomatosis (2), estrongiloidiasis (5) y cisticercosis (27), además de patologías autoinmunitarias: factor reumatoide (9) y anticuerpos antinucleares (32).

Especificidad del WB de referencia = 95,7 %

Especificidad de TRICHINELLA E/S WB IgG = 96,4 %

Nota: Un estudio sistemático realizado a partir de 500 muestras de donantes de sangre ha evidenciado una prevalencia del 2,4 % de serología positiva en el kit TRICHINELLA ES WB IgG. Este valor se sitúa en el 6,4 % en el WB de referencia. Estos resultados de intensidad a menudo débil pero aun así sorprendente se publicaron en 2011 durante el XIII ICT (International Congress on Trichinellosis). Todavía no se ha encontrado una explicación.

Conclusión

La correlación entre **TRICHINELLA ES WB IgG** y el estado clínico es excelente.

Sensibilidad Se = 97,5% [CI95 91,2 – 98,5%]

Especificidad Sp = 96,4% [CI95 90,4 – 99,6%]

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, ictericos 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

- H. Barennes, S. Sayasone, P. Odermatt, A. De Bruyne, S. Hongsakhone, P. N. Newton, P. Vongphrachanh, B. Martinez-Aussel, M. Strobel, et J. Dupouy-Camet, « A major *Trichinellosis* outbreak suggesting a high endemicity of *Trichinella* infection in northern Laos », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 78, n° 1, p. 40-44, janv. 2008.
- P. Dorny, N. Praet, N. Deckers, et S. Gabriel, « Emerging food-borne parasites », *Vet. Parasitol.*, vol. 163, n° 3, p. 196-206, août 2009.
- J. Dupouy-Camet, H. Talabani, et T. Ancelle, « *Trichinellosis* », *Rev Prat*, vol. 60, n° 2, p. 159-164, févr. 2010.
- J. Dupouy-Camet, « *Trichinellosis* : still a concern for Europe », *Euro Surveill.*, vol. 11, n° 1, p. 5, 2006.
- B. Gottstein, E. Pozio, et K. Nockler, « Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of *Trichinellosis* », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, n° 1, p. 127-145, janv. 2009.
- K. Nöckler, S. Reckinger, A. Broglia, A. Mayer-Scholl, et P. Bahn, « Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera », *Vet. Parasitol.*, vol. 163, n° 4, p. 341-347, août 2009.
- E. Pozio et D. S. Zarlenga, « New pieces of the *Trichinella* puzzle », *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, n° 12-13, p. 983-997, nov. 2013.
- E. Pozio, « World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans », *Vet. Parasitol.*, vol. 149, n° 1-2, p. 3-21, oct. 2007.
- E. Pozio, « The opportunistic nature of *Trichinella*-exploitation of new geographies and habitats », *Vet. Parasitol.*, vol. 194, n° 2-4, p. 128-132, mai 2013.
- H. Yera, S. Andiva, C. Perret, D. Limonne, P. Boireau, et J. Dupouy-Camet, « Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human *Trichinellosis* », *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 10, n° 5, p. 793-796, sept. 2003.
- Yera H., Mergey T., Limonne D., Lureau P. Dupouy-Camet J., « Seroprevalence of *Trichinella* antibodies in blood donors in France. », sometido a 13th ICT (Int. Conf. on *Trichinellosis*), Changchun, China, 2011.

Notificación de actualización: lea atentamente

FECHA DE LANZAMIENTO	VERSION	RESUMEN DE MODIFICACIONES
31/07/2020	Vs 14	Diseño - Reactivos suministrados - Precauciones de uso - Estabilidad - Recogida de muestras - Procedimiento de prueba - Control de calidad e interpretación
12/08/2021	Vs 15	Eliminación de la advertencia de seguridad R5 - Dirección de correo electrónico de contacto – NaN3 EUH 032.



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