



Kit de prueba de LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna

Para la detección de anticuerpos contra coccidioides REF CTA2003

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.



USO PREVISTO

El ensayo de flujo lateral (LFA) de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna se utiliza para la detección cualitativa de anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra antígenos TP y FC de especies de *Coccidioides*, como ayuda en el diagnóstico de coccidioidomicosis en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR).

EXPLICACIÓN

Las especies de *Coccidioides* son hongos dimórficos que existen como micelios (crecimiento saprobio) o esférulas (crecimiento parasitario) que causan enfermedades respiratorias y, en ocasiones, enfermedades que afectan a otros sistemas¹. Aunque es endémica en el sudoeste de los Estados Unidos y México, el incremento de los viajes a las áreas endémicas también aumentó la incidencia en las áreas no endémicas^{1,2}. Se debe considerar la coccidioidomicosis siempre que los pacientes tengan síntomas de infección pulmonar o meningea y hayan vivido en las áreas endémicas o hayan viajado allí³.

La coccidioidomicosis presenta una dificultad en el diagnóstico para el médico y el laboratorista. Las manifestaciones de la mayoría de las infecciones coccidioidales tempranas se superponen sustancialmente con las de otras infecciones respiratorias⁴. Además, cultural e histológicamente, los organismos pueden ser difíciles de evidenciar, incluso después de repetidos intentos^{1,2}. Por lo tanto, generalmente se requieren pruebas de laboratorio específicas para establecer un diagnóstico de coccidioidomicosis.

Las pruebas serológicas sirvieron durante varias décadas como ayuda en el diagnóstico y tratamiento de la coccidioidomicosis¹. La fijación del complemento (FC), la inmunodifusión (ID) y el inmunoensayo enzimático (EIA) son los métodos serológicos más utilizados. El ensayo de la FC es sensible; sin embargo, su desempeño es complejo y laborioso. Además, el ensayo de la FC muestra una baja especificidad debido a la reacción cruzada de los anticuerpos que reconocen fracciones de carbohidrato comunes a varios hongos. El ensayo de ID es más específico, pero menos sensible que el ensayo de la FC; además, la ID tarda 48 horas en hacerse y requiere personal altamente calificado para interpretar correctamente los resultados. El EIA es sensible y específico, pero requiere equipo de laboratorio adicional. Sin embargo, el LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna es una prueba sensible, específica y rápida para la detección cualitativa de anticuerpos IgM e IgG dirigidos contra antígenos TP y FC de especies de *Coccidioides*.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna utiliza una mezcla de antígenos *Coccidioides* modificados y nativos, incluidos los antígenos FC y TP, adsorbidos en nitrocelulosa. Los anticuerpos contra los antígenos TP se forman temprano en el curso de la enfermedad (típicamente IgM), seguidos de anticuerpos contra la FC (típicamente IgG)¹. El ensayo no distingue entre IgG e IgM. Las muestras diluidas de pacientes se aplican a las tiras del LFA. Si hay anticuerpos anticoccidioides presentes en las muestras de pacientes, los anticuerpos se unirán a los antígenos adsorbidos. Si los anticuerpos del paciente se unen a los antígenos adsorbidos, las proteínas de unión a anticuerpos conjugadas con oro se unirán a los anticuerpos del paciente y el resultado será la formación de una línea de prueba roja (positiva) y una línea de control. Si los anticuerpos del paciente no se unen a los antígenos adsorbidos, el conjugado de oro se unirá solo a la línea de control (negativo).

REACTIVOS

- Tiras de prueba de flujo lateral de anticuerpos contra *Coccidioides* (REF LFCA50) (50 tiras): tiras empaquetadas en un tubo desecante.
- Diluyente de muestras (REF LFASD1) (25 ml): solución de proteína tamponada con conservante.
- Control positivo de anticuerpos contra *Coccidioides* (REF CTAPC1) (1 ml): mezcla de anticuerpos anticoccidioides en una solución proteica tamponada con conservante.

PRECAUCIONES DE REACTIVOS

- Todos los reactivos están destinados para uso de diagnóstico in vitro (IVD).
- Es necesaria una estandarización específica para producir nuestros reactivos y materiales de alta calidad. IMMY no puede garantizar el rendimiento de sus productos cuando se utilizan con materiales comprados a otros fabricantes. No intercambie reactivos de diferentes números de lote de kit o de otros fabricantes.
- Utilice únicamente los protocolos descritos en este prospecto. Los tiempos de incubación o las temperaturas diferentes a las especificadas pueden dar resultados erróneos. El usuario asume toda la responsabilidad por cualquier modificación de los procedimientos publicados en este documento.
- Utilice siempre guantes cuando manipule los reactivos de este kit, ya que algunos reactivos se conservan con azida sódica al 0,095 % (p/p). La azida sódica no se debe desechar por el desagüe, ya que este producto químico puede reaccionar con el plomo o tuberías de cobre y formar azidas metálicas potencialmente explosivas. El exceso de reactivos debe desecharse en un recipiente de residuos adecuado.
- Evite las salpicaduras al dispensar reactivos en los tubos o pocillos de las placas, ya que esto puede provocar resultados erróneos.
- Utilice puntas de pipeta desechables nuevas cuando corresponda para evitar la contaminación de los resultados.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Todo el kit de LFA de anticuerpos contra *coccidioides* sōna debe almacenarse a una temperatura de entre 2 y 25 °C hasta las fechas de vencimiento que se indican en la etiqueta del kit.

Las tiras de LFA sin usar deben guardarse en el tubo desecante, y este tubo debe permanecer sellado cuando no se use.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Recolecte muestras asépticamente usando técnicas establecidas por personal calificado. Al manipular muestras de pacientes, se deben tomar las medidas adecuadas para evitar la exposición a agentes etiológicos potencialmente presentes. No se estableció el uso de muestras distintas del suero.

Para obtener resultados óptimos, se deben utilizar muestras estériles. Las muestras deben analizarse lo antes posible, pero pueden almacenarse hasta 5 días a una temperatura de entre 2 y 8 °C antes de la prueba. Si se requiere un almacenamiento más prolongado, se deben congelar (de -20 a -80 °C) varias alícuotas de cada muestra para evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación. No almacene en un congelador que no forma escarcha.

Suero

Diluya el suero **1:441** con diluyente de muestras de la siguiente manera:

- Obtenga 2 tubos para cada muestra de suero. Transfiera 200 µl de diluyente de muestra al primer tubo y 200 µl al segundo tubo.
- Mezcle bien la muestra.
- Transfiera 10 µl de suero al primer tubo y mezcle bien.
- Transfiera 10 µl de la primera dilución al segundo tubo y mezcle bien (dilución **1:441**).

LCR

Diluya **1:21** de LCR con diluyente de muestra de la siguiente manera:

- Obtenga 1 tubo para cada muestra de LCR. Transfiera 200 µl de diluyente de muestra a este tubo.
- Mezcle bien la muestra.
- Transfiera 10 µl de LCR al primer tubo y mezcle bien (dilución **1:21**).

PROCEDIMIENTO

CONSULTE LA SECCIÓN DE REACTIVOS PARA OBTENER UNA LISTA DE LOS MATERIALES SUMINISTRADOS.

MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- Pipetas en las que se pueda medir y entregar 10 µl, 100 µl, 200 µl y puntas desechables adecuadas.
- Tubos para dilución de muestras.
- Tubos de fondo plano o placa de ensayo de 96 pocillos (sin tratar) para llevar a cabo la prueba.
- Temporizador.

PROCEDIMIENTO

Suero

- Si el kit no estaba almacenado a temperatura ambiente, póngalo a esa temperatura.
- Suministre 100 µl de cada muestra de suero diluido 1:441 en tubos de fondo plano o pocillos de placa separados. Asegúrese de que toda la muestra esté en el fondo del tubo.
- Inserte la tira en el tubo o pocillo dentro de los 10 minutos (↓ ↓ hacia abajo).
- Incuba a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) durante 30 a 60 minutos.
- Lea y registre los resultados (ver LECTURA DE LA PRUEBA).

LCR

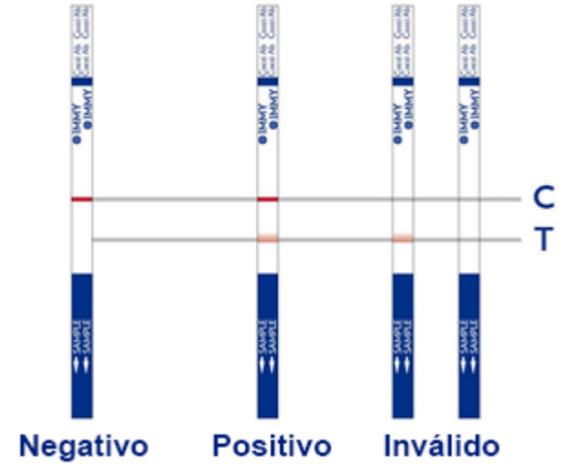
- Si el kit no estaba almacenado a temperatura ambiente, póngalo a esa temperatura.
- Suministre 100 µl de cada muestra de LCR diluida 1:21 en tubos de fondo plano o pocillos de placa separados. Asegúrese de que toda la muestra esté en el fondo del tubo.
- Inserte la tira en el tubo o pocillo dentro de los 10 minutos (↓ ↓ hacia abajo).
- Incuba a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) durante 30 a 60 minutos.
- Lea y registre los resultados (ver LECTURA DE LA PRUEBA).

PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

- Se recomienda realizar el procedimiento de control de calidad con cada envío nuevo o lote recibido.
- Agregue 3 gotas (120 µl) de control positivo de anticuerpos contra *Coccidioides* sin diluir (REF CTAPC1) en un tubo o pocillo de placa.
- Pipetee 100 µl de diluyente de muestra (REF LFASD1) en un tubo o placa de pocillo.
- Inserte la tira en tubos o pocillos (↓ ↓ hacia abajo).
- Incuba a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) durante 30 a 60 minutos.
- Lea y registre los resultados (ver LECTURA DE LA PRUEBA).

LECTURA DE LA PRUEBA

- Asegúrese de que todo el reactivo/muestra se haya absorbido por completo del tubo o pocillo en la tira reactiva al final de la incubación.
- La presencia de una sola línea de control (C=Control; ver diagrama) es un resultado negativo.
- La presencia de 2 líneas rosas o rojas (C=Control y T=Test) es un resultado positivo. El ancho de la línea de prueba puede variar. Nota: una línea de prueba gris no debe considerarse positiva. Puede sostener la tira contra un fondo blanco como ayuda para distinguir una línea de prueba.
- La prueba debe leerse dentro de los 60 minutos posteriores a la incubación. Después de esta franja de tiempo, la lectura puede proporcionar resultados erróneos.



CONTROL DE CALIDAD

En el momento de cada uso, los componentes del kit deben inspeccionarse visualmente para detectar signos evidentes de contaminación microbiana (turbidez o partículas), congelamiento o pérdidas. Deseche si se encuentran estas condiciones.

La línea de control debe estar presente para obtener resultados válidos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna está diseñado para usarse con muestras de suero y LCR solo para ayudar en el diagnóstico de coccidioidomicosis. Las características de rendimiento de este ensayo no se evaluaron para otros tipos de muestras. El médico debe revisar todos los resultados a la luz de otros datos clínicos.

Un resultado negativo de la prueba no excluye el diagnóstico de coccidioidomicosis, particularmente si solo se analizó una muestra y el paciente muestra síntomas consistentes con un diagnóstico positivo. El diagnóstico de la coccidioidomicosis se basa en hallazgos clínicos y de laboratorio.

INTERFERENCIA

Este ensayo se evaluó por el potencial de interferencia debido a condiciones séricas que incluyen muestras ictericas, hemolizadas y lipémicas. También se evaluaron las condiciones del líquido cefalorraquídeo relacionadas con niveles altos de bilirrubina, sangre, proteínas y yodo. Estas muestras no mostraron interferencia en el ensayo.

ANÁLISIS DE REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada del LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna frente a un panel de muestras de suero de pacientes en una variedad de patologías. Los resultados de esta prueba se muestran en la siguiente tabla.

Patología	N.º de muestras	% positivo
Micoplasmosis	5	20 % (1/5)
VIH+	5	0 % (0/5)
ANA +	4	0 % (0/4)
Blastomicosis	2	0 % (0/2)
Criptococosis	4	0 % (0/4)
Histoplasmosis	5	80 % (4/5)
Anticuerpo contra aspergillus +	5	0 % (0/5)
Rh+	4	0 % (0/4)

No se evaluó la reactividad cruzada de este ensayo frente a los siguientes organismos o patologías:

<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichosporon beigeli</i>
<i>Candida parapsidosis</i>	<i>Zygomycetes</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Estafilococo aureus</i>
<i>Candida glabrata</i>	Virus de la Hepatitis A
<i>Cladosporium trichoides</i>	Virus de la hepatitis C
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Streptococcus pneumonia</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>Enterovirus</i>	<i>Difteroide</i>

<i>Enterobacterias</i>	<i>H influenzae</i> tipo B
<i>Enterococcus spp.</i>	Virus del herpes simple
<i>Epstein Barr</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

Condensación de fluido de sinéresis

No se evaluó la reactividad cruzada en muestras de LCR.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

SUERO

Comparación de métodos de inmunodifusión

El LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna se comparó con la inmunodifusión (ID) de *Coccidioides* realizada en un laboratorio de referencia para evaluar el porcentaje de concordancia en las muestras de suero. Los resultados se pueden encontrar en las siguientes tablas. Nota: todas las muestras se enviaron al laboratorio de referencia porque los médicos sospechaban que podía haber una infección por *Coccidioides*.

	Inmunodifusión			
	IgG e IgM positivos	IgG positivo solamente	IgM positivo solamente	IgG e IgM negativos
Pos CTA2003	15	102	24	5
CTA2003 negativo	0	1	1	57

	Inmunodifusión general	
	Positivo	Negativo
Pos CTA2003	141	5
CTA2003 negativo	2	57

	Punto estimado	IC del 95 %
Acuerdo porcentual positivo	98,6 %	95,0 % - 99,8 %
Acuerdo porcentual negativo	91,9 %	82,2 % - 97,3 %
Cociente de verosimilitudes positivas	12,23	5,27 - 28,34
Cociente de verosimilitudes negativas	0,02	0,00 - 0,06
Valor predictivo positivo	96,6 %	92,2 % - 98,9 %
Valor predictivo negativo	96,6 %	88,3 % - 99,5 %

Comparación de métodos de inmunoensayo enzimático (EIA)

Se comparó el LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna con un inmunoensayo enzimático (EIA) de coccidioidomicosis disponible comercialmente en muestras enviadas a un laboratorio de referencia para evaluar el porcentaje de concordancia en las muestras de suero. Los resultados se pueden encontrar en las tablas a continuación. Nota: los datos indeterminados se eliminaron de los datos para los cálculos de estimación puntual.

	EIA		
	Positivo	Indeterminado	Negativo
Pos CTA2003	139	0	7*
CTA2003 negativo	3	2	54

	Punto estimado	IC del 95 %
Acuerdo porcentual positivo	97,9 %	93,9 % - 99,5 %
Acuerdo porcentual negativo	88,5 %	77,7 % - 95,2 %
Valor predictivo positivo	95,2 %	90,4 % - 98,0 %
Valor predictivo negativo	94,7 %	85,4 % - 98,8 %

* Dos muestras fueron ID o FC positivas

Comparación de métodos de fijación del complemento (FC)

Se comparó el LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna con la fijación del complemento (FC) de *Coccidioides* realizada en un laboratorio de referencia para evaluar el porcentaje de concordancia en muestras de suero. Los resultados se pueden encontrar en las tablas a continuación. Nota: Todas las muestras se enviaron al laboratorio de referencia porque los médicos sospechaban que podía haber una infección por *Coccidioides*.

	Fijación del complemento	
	Positivo	Negativo
Pos CTA2003	91	5
CTA2003 negativo	2	56

	Punto estimado	IC del 95 %
Acuerdo porcentual positivo	97,9 %	92,4 % - 99,7 %
Acuerdo porcentual negativo	91,8 %	81,9 % - 97,3 %
Valor predictivo positivo	94,8 %	88,7 % - 97,7 %
Valor predictivo negativo	96,6 %	87,6 % - 99,1 %

En el mismo estudio, se determinó que un total de 37 muestras negativas de fijación del complemento dieron positivo para anticuerpos *anticoccidioides* porque dieron positivo en el EIA de anticuerpos contra *coccidioides* de IMMY (REF. n.º CAB102), otro EIA de anticuerpos contra *coccidioides* disponible comercialmente y un ensayo de inmunodifusión. Estas 37 muestras también dieron positivo en CTA2003. Estas muestras fueron excluidas del análisis que menciona más arriba.

Rendimiento de especificidad

Se evaluó la especificidad del LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna utilizando muestras de suero de donantes de sangre sanos de una región endémica (Arizona n=121) y una región no endémica (Puerto Rico n=45). Lindsley et. al. describe estas muestras (5). A continuación se incluyen tablas de resumen de los datos recopilados.

	Supuesto negativo	
	Negativo	
Pos CTA2003	6	
CTA2003 negativo	160	

	Punto estimado	IC del 95 %
Especificidad	96,4 %	92,3 % - 98,7 %

* Los 6 positivos son de la región endémica. Ninguna muestra de la región no endémica fue positiva en el LFA.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

Comparación de métodos EORTC

Se evaluó el LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna a una dilución de 1:21 mediante muestras de LCR definidas por la EORTC y comparadas con el estado real del paciente (EORTC)⁶.

	Meningitis por <i>Coccidioides</i>	
	Positivo	Negativo
Pos CTA2003	40	0
CTA2003 negativo	2	12

	Punto estimado	IC del 95 %
Sensibilidad	95,2 %	83,8 % - 99,3 %
Especificidad	100 %	73,4 % - 100 %
Valor predictivo positivo	100 %	91,1 % - 100 %
Valor predictivo negativo	85,7 %	57,2 % - 97,8 %

REPRODUCIBILIDAD

Se evaluó la reproducibilidad y la precisión del LFA de anticuerpos contra *Coccidioides* sōna mediante el análisis de tres muestras de suero positivas y dos muestras de suero negativas. Las muestras positivas analizadas oscilaron entre positivo fuerte y muy débil, según el EIA de anticuerpos contra *coccidioides* de IMMY (REF. CAB102). Se evaluó este panel por triplicado, diariamente durante cinco días y lo leyó un operador. Los resultados del estudio se muestran en la siguiente tabla.

SUERO

	% total pos.
Positivo alto	100 % (15/15)
Positivo bajo	100 % (15/15)
Positivo bajo	100 % (15/15)
Negativo	0 % (0/15)
Negativo	0 % (0/15)

LCR

	% total pos.
Positivo alto	100 % (15/15)
Positivo bajo	100 % (15/15)
Positivo bajo	100 % (15/15)
Negativo	0 % (0/15)
Negativo	0 % (0/15)

BIBLIOGRAFÍA

- Pappagianis, D. and B.L. Zimmer. 1990. Serology of coccidioidomycosis. Clin. Microbiol. Reviews, 3:247-268
- Bronnimann, D. A., J. N. Galgiani. 1989. Coccidioidomycosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8:466-473
- Rose, Hamilton, Detrick. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th Edition. Pg 568-570.
- Galgiani, J. 2000. Coccidioides immitis. Principles and Practice of Infectious Diseases. Eds. Mandell, Douglas, and Bennett. pp. 2746-2757.
- Lindsley, M.D., Y. Ahn, O. McCotter, L. Gade, S.F. Hurst, M.E. Brandt, B.J. Park, and A.P. Litvinseva. 2015. Clin Vaccine Immunol., 22 (10): 1090-5.
- Stevens, D.A., Martinez, M., Sass, G., Pappagianis, D., Doherty, B., Kutsche, H., McGuire, M. Comparative Study of Newer and Established Methods of Diagnosing Coccidioid Meningitis. 2020. Journal of Fungi, 6, 125.

USO DE SÍMBOLOS INTERNACIONALES

	Almacenamiento de 2 a 25 °C		Número de lote
	Fabricado por		Número de referencia
	Fecha de caducidad		Diagnóstico in vitro
	Proteger de la humedad		Suficiente para "n.º" pruebas

IMMY, Inc.
2701 Corporate Centre Drive Norman,
OK 73069, EE. UU.
(405) 360-4669/(800) 654-3639
Fax: (405) 364-1058
Correo electrónico:
info@immy.com Sitio
web:www.immy.es

Rdo. n.º 8
Rev. 25-03-2022

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Diluya el suero 1:441 con diluyente de muestras:

- 1** Obtenga 3 tubos de fondo plano para cada muestra de suero.
- 2**
- 3**
- 4**

LLEVAR A CABO LA PRUEBA

Diluya LCR 1:21 con diluyente de muestras:

- 1** Obtenga 2 tubos de fondo plano para cada muestra de LCR.
- 2**
- 3**
- 4**