



PERÚ

Ministerio  
de Salud

INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS NEUROLÓGICAS





**Guía Técnica de Procedimientos para la  
evaluación de suero y líquido  
cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico  
de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la  
Técnica de Western Blot**

**2019**





Jr. Ancash 1271  
Barrios Altos, Lima 1 – Perú  
Dirección General – Teléfono 328-1473  
Fax 328-7382 Central telefónica 411-7700  
[www.icn.minsa.gob.pe](http://www.icn.minsa.gob.pe)



 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 2</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## INDICE

N°	Denominación	Folio
1	Caratula	1
2	Índice	2
3	Título	3
4	Presentación	4
5	Finalidad	5
6	Objetivo	6
7	Ámbito de Aplicación	7
8	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar	8
9	Consideraciones Generales	9-10
10	Consideraciones Específicas	11
11	Descripción detallada del proceso o procedimiento	12-26
12	Recomendaciones	27
13	Bibliografía	28
14	Anexos	29

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 3</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

**GUÍA TÉCNICA DE PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACION DE SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) PARA EL DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS, HIDATIDOSIS MEDIANTE LA TECNICA DE WESTERN BLOT.**

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b>		Pág. 4
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		



## PRESENTACIÓN

En nuestro país, algunas de las zoonosis parasitarias más importantes son la cisticercosis, Hidatidosis siendo la primera una parasitosis humana más frecuente del sistema nervioso central y es causada por las larvas del cestodo *Tenia solium* y la Hidatidosis causada por *Echinococcus granulosus*, es la especie de mayor importancia desde el punto de vista de salud pública y se basa en la detección de anticuerpos circulantes. Las tasas de prevalencia son altas comparadas con otros países. La sospecha clínica y epidemiológica es importante pero el diagnóstico se realiza primariamente por imágenes y se confirma con serología.

Dentro del diagnóstico clínico de rutina, el procesamiento de la muestra en caso del suero, Líquido cefalorraquídeo (LCR) es un procedimiento de mucho cuidado ya que necesita adecuada preparación y atención a ciertos requisitos de manipulación para la confiabilidad del resultado.



El Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) en cumplimiento a la Resolución Ministerial N° 603-2006-SA/DM, modificada por las Resoluciones Ministeriales N° 809-2006/MINSA, N° 205-2009/MINSA y N° 317-2009/MINSA, N° 011-2014/MINSA, aprobó la Directiva N° 007-MINSA/OGPE-V.02 "Directiva para la Formulación de Documentos Técnicos Normativos de Gestión Institucional y sus modificatorias que debe formular el Manual de Procesos y Procedimientos, diseñado de acuerdo al modelo de gestión por procesos donde se percibe a la organización como un sistema interrelacionado de procesos generadores de valor con orientación al cliente.

Por lo tanto en la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado, ha elaborado y estandarizado una "Guía técnica de procedimientos para la evaluación de las muestras de suero, Líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis e Hidatidosis mediante el uso de la técnica de Western blot (WB)" dicho Manual de Procedimientos constituye una guía para la correcta aplicación de las normas y procedimientos de diagnóstico serológico establecidos en las unidades orgánicas siendo el Jefe de la Unidad de Neurocisticercosis el encargado del cumplimiento de los procedimientos mencionados.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 5</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## I. FINALIDAD

- La presente guía se ha elaborado con el propósito de precisar y facilitar para el cumplimiento secuencial de la técnica del Western blot que sirva como herramienta en el diagnóstico de Cisticercosis y Hidatidosis.
- Su contenido pretende que el Instituto cuente con un instrumento formal que muestre los métodos de trabajo o forma de realizar una actividad o tarea.
- Sirve de instrumento de apoyo técnico administrativo en el funcionamiento institucional, contribuyendo a la implementación del sistema de gestión de la calidad en salud y sus actividades dirigidas a la mejora continua de los procesos a través de la aplicación de técnicas y herramientas para la gestión de la calidad.
- Se pretende mejorar la calidad de los servicios y de procesos a través de la aplicación de dicha técnica como una herramienta para el diagnóstico de dichas enfermedades mediante la atención a los usuarios nuevos de la Institución.
- Integrar el conocimiento y promover la optimización de los recursos para buscar mejoras en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con neurocisticercosis e hidatidosis.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>	 <b>INCN</b>	Pág. 6
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		



## II. OBJETIVOS

### Objetivo General:

- Establecer una guía técnica estandarizada para la evaluación de las muestras de Suero y LCR mediante la técnica serológica (Western blot) para el diagnóstico de Cisticercosis y Hidatidosis en muestras de Suero y LCR.



### Objetivo Específicos:

- Establecer las pautas y pasos detallados para la elaboración de los diferentes procedimientos que se desarrolla en el laboratorio tanto para el diagnóstico de Cisticercosis como Hidatidosis mediante la técnica de Western Blot.
- Seguir promoviendo la implementación y proyectos para la mejora continua de la calidad en salud y servicios médicos de apoyo.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>		Pág. 7
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		

### III. AMBITO DE APLICACION



- La presente Guía Técnica Puede ser aplicado en los laboratorios de establecimientos de salud que cuenten con personal calificado, instalaciones, equipos y materiales idóneos para llevar a cabo el diagnóstico serológico de Western Blot en muestras de suero y LCR.
- Dicha guía fue estandarizada en el laboratorio para la aplicación en el diagnóstico de estas zoonosis (Diagnostico de Cisticercosis e Hidatidosis), considerando que la demostración directa del parásito no siempre es posible por las características de estas infecciones.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>		Pág. 8
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		

**IV. NOMBRE DEL PROCESO O PROCEDIMIENTO A ESTANDARIZAR**

1. Identificar con precisión el proceso o procedimiento a estandarizar.
  - Prueba de Western blot para Cisticercosis
  - Prueba de Western blot para Hidatidosis
  
2. Identificar el Código CPT
  - Cisticercosis 86690
  - Hidatidosis 86691





 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 9</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## V. CONSIDERACIONES GENERALES

### DEFINICIONES OPERATIVAS:

- **Anticuerpo:** Es una proteína producida por el sistema inmunológico para identificar y neutralizar elementos extraños, tales como bacterias, virus o parásitos. Cada tipo de anticuerpo es único y defiende al cuerpo de un tipo de antígeno específico
- **Antígeno:** Es cualquier sustancia que provoca que el sistema inmunológico produzca anticuerpos contra sí mismo.
- **Muestra:** Fluido problema puede ser para este caso suero o líquido cefalorraquídeo
- **Western Blot:** Llamado también inmunoblot es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, mediante la Electroforesis y transferencia.
- **Electroforesis:** La electroforesis consiste en someter a un campo eléctrico una mezcla de proteínas cargadas negativamente las cuales migran a través de una matriz (gel de poliacrilamida), cuya densidad determinará la distribución final de éstas en base a su masa
- **Transferencia:** Proceso que permite el paso de proteínas desde el gel hacia otro soporte (membrana de nitrocelulosa). Esto permite inmovilizar y conservar las proteínas por más tiempo y desarrollar sobre éste las pruebas de inmunodetección.
- **Inmunodetección:** Proceso de enfrentamiento de las proteínas fijas en la membrana de nitrocelulosa, con fluidos que puedan contener anticuerpos, como suero o líquido cefalorraquídeo
- **Resultado:** Consiste en visualizar las tiras de nitrocelulosa con la presencia o ausencia de bandas Reactivas, con el reconocimiento de uno o más péptidos antigénicos presentes para cada una de las enfermedades en las muestras problema.
- **Dilución:** Mezcla de una sustancia con una o más partes de otra (diluyente) que no altera las características de la primera y reduce su concentración
- **Cisticercos:** Forma larvaria (metacéstodo) en la familia Taeniidae constituido por una vesícula llena de líquido que contiene un solo escolex invaginado DAB: 3,3' diaminobenzidine
- **Quiste hidatídico:** Estado larval de la tenia del género Echinococcus que consiste en una vesícula grande que posee una membrana germinal interna desde la cual los escolex y los quiste hijos avanzan para proyectarse en la vesícula
- **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida y sulfato dodecil de sodio.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p align="center"><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p align="center"><b>INCN</b></p>	<p align="right">Pág. 10</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## CONCEPTOS BÁSICOS

- **Zoonosis:** enfermedad de animales transmisibles a los seres humanos.
- **Proceso.-** Es el conjunto de etapas sucesivas de una operación (administrativa, asistencial, etc.) que genera un resultado que agrega valor globalmente.
- **Acciones de Mejora.-** Conjunto de actividades preventivas, correctivas y de innovación en los procesos de la organización para la mejora continua.
- **Calidad de la Atención.-** Conjunto de actividades que realizan los establecimientos de salud y los servicios médicos de apoyo en el proceso de atención, desde el punto de vista técnico y humano, para alcanzar los efectos deseados tanto por los proveedores como por los usuarios, en términos de seguridad, eficacia, eficiencia y satisfacción del usuario.
- **Oportunidad de Mejora.-** Es el proceso de atención al usuario externo mediante el análisis de la información generada por una herramienta y que es factible de mejorarse.
- **Fiabilidad.-** Capacidad para cumplir exitosamente con el servicio ofrecido.
- **Usuario Externo.-** Persona que acude a un establecimiento de salud para recibir una atención de salud de manera continua y con calidad, en el contexto de familia y comunidad.
- **Establecimiento de Salud.-** Entiéndase por establecimientos de salud aquellos que realizan, en régimen ambulatorio o de internamiento, atenciones de salud con fines de prevención, promoción, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación dirigidas a mantener o restablecer el estado de salud de las personas



## REQUERIMIENTOS BÁSICOS

**Recurso Humano.-** Para la aplicación se cuenta con personal médico, técnico y operativo que son responsables de seguir las especificaciones técnicas y aplicaciones de los procedimientos específicos indicado.

**Herramienta informática.-** Se cuenta con personal para el registro, análisis y reporte de resultados.



**Infraestructura.-** Actualmente el laboratorio cuenta con un ambiente habilitado especialmente para funcionar como tal con un ambiente de recepción, para toma de muestra y un laboratorio de 35 m<sup>2</sup> para el manejo de la técnica.

**Suministros.-** Se cuenta con una adecuada provisión de materiales de laboratorio, materiales de oficina y equipo de protección personal. Estos suministros se renuevan continuamente mediante pedidos actualizados.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 11</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## VI. CONSIDERACIONES ESPECIFICAS

- Paso 1: Atención al paciente
- Paso 2: Toma de muestra
- Paso 3: Ejecutar (desarrollo de la técnica).
- Paso 4: Resultados.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p align="center"><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p align="center"><b>INCN</b></p>	<p align="right">Pág. 12</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

## VII. DESCRIPCION DETALLADA DEL PROCESO O PROCESAMIENTO (PASO 1, 2, 3 y 4)

Todos estos procedimientos detallados a continuación constituyen la técnica de Western Blot, que es realizado en la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado del INCN, Lima, para el diagnóstico serológico de cisticercosis e Hidatidosis Este método permite observar la reacción de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes frente al antígeno de *T. solium* o al antígeno de *E. granulosus*.

- Atención de pacientes
- Toma de Muestra
- Técnica de Western Blot
  - ❖ Electroforesis
  - ❖ Transferencia
  - ❖ Immunodetección
- Resultados

### 8.1. ATENCION DE PACIENTES

#### 8.1.1. Introducción

Dentro del diagnóstico clínico de rutina o dentro de cualquier estudio, la atención a los pacientes es uno de los procesos claves. El paciente debe sentirse satisfecho de la atención brindada en la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado del INCN, Lima.



#### 8.1.2. Objetivo

Los Procedimientos Operacionales Estándares aquí descritos describen la atención y recepción brindada por la Unidad de Neurocisticercosis.

#### 8.1.3. Materiales y Equipos

- Computadoras
- Monitores
- Impresora
- Papel bond A4
- Lapiceros
- Archiveros de palanca tamaño oficio
- Archiveros de palanca lomo ancho A4
- Etiquetas poliester
- Estabilizadores
- Porta lapiceros
- Cuadernos A4
- Cartucho color negro
- Chinchas metálicos
- Cinta mágica scotch
- Clip mariposa gigante
- Perforador.
- Mascarilla N95 o equivalente.
- Careta protectora.
- Alcohol en gel.

#### 8.1.4. Procedimiento

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 13</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

1. Control y extracción de data
  - 1.1. El control y la extracción de información de datos de los pacientes ha sido delegado al personal Técnico de sistema, bajo entrenamiento y siguiendo las medidas de protección personal adecuadas al escenario actual de pandemia.
  - 1.2. Recepción de orden de examen.
2. Se recepciona orden de Western blot para Cisticercosis o Hidatidosis proveniente de consulta externa SIS o por referencia SIS (con FUA y debidamente sellados).
3. Registra y emite orden de trabajo de laboratorio
  - 3.1. Los datos de la orden de examen de laboratorio y del paciente se registran en el sistema informático respectivo.
  - 3.2. Una vez registrados los datos en el sistema se emite la orden de trabajo de laboratorio.
4. Registro de resultados de western blot para Cisticercosis e Hidatidosis en sistema.
  - 4.1. Los resultados del examen realizado es registrado en el sistema informático. En Caso de pacientes por referencias SIS se llena el formato FUA.
5. Impresión resultados de Western blot para Cisticercosis e Hidatidosis Una vez realizado el registro, los resultados son impresos.
  - 5.1. Elaboración del reporte mensual del SIS. Al culminar el mes se extrae la información de cada paciente ingresado y se elabora el reporte mensual del SIS para ser entregado a los responsables de cada servicio para su trámite respectivo.

## 8.2. TOMA DE MUESTRA

### 8.2.1. Introducción

Dentro del diagnóstico clínico de rutina o dentro de cualquier estudio, la toma de muestras de sangre o LCR es uno de los procesos claves. La colecta o toma de sangre es un procedimiento potencialmente peligroso que necesita adecuada preparación y atención a ciertos requisitos de seguridad. Las muestras de sangre son tomadas en la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado del INCN, Lima y lo que respecta a la toma de muestra de LCR, esto es realizado por el médico autorizado de acuerdo a su criterio de evaluación.

### 8.2.2. Objetivo

Los Procedimientos Operacionales Estándares aquí descritos describen el proceso de toma de muestra de sangre bajo diferentes técnicas y su manipulación y transporte hasta el laboratorio.



### 8.2.3. Materiales y Equipos

- Tubos para extracción de sangre al vacío
- Agujas para extracción de sangre al vacío
- Adaptador para agujas de toma de muestra al vacío
- Viales para almacenaje de muestras
- Lancetas estériles
- Papel filtro
- Buffer de dilución (ver portocolo Fingerprick)
- Guantes
- Torundas de algodón
- Alcohol yodado
- Ligadura para torniquete
- Esparadrapo
- Gradillas para muestras
- Contenedor de desechos con bioseguridad

Versión : 1.0

Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.

- Contenedor de agujas
- Etiquetas impresas con código numérico y código de barras
- Orden de laboratorio (generada por el médico)
- Registro escrito de los datos del paciente
- Silla con brazos para venopunción
- Centrífuga con rotor para tubos que alcance hasta 5000 rpm.
- Sonicador de lavado
- Mascarilla N95 o equivalente.
- Lentes de protección,
- Bata descartable.
- Alcohol en gel.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 15</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		



#### 8.1.4. Procedimiento

##### 1. Obtención de Consentimiento Informado:

- 1.1. El procedimiento de obtención de consentimiento informado ha sido delegado al personal técnico encargado de la toma de muestra, bajo entrenamiento y supervisión del jefe de laboratorio y del responsable de ética.
- 1.2. Entrega del consentimiento informado y explicación al paciente y/o familiares del(os) objetivo(s) del estudio, las condiciones descritas en dicho consentimiento, las características del procedimiento a realizar, los riesgos que implica la toma de muestra y la cualidad de la aceptación del consentimiento informado de ser libre y voluntaria, **teniendo en cuenta las medidas de protección personal adecuadas al escenario actual de pandemia.**
- 1.3. Resolver cualquier duda formulada por el paciente sin ninguna premura de tiempo, si fuera necesario recurrir al investigador principal o al responsable de ética.
- 1.4. Archivar los consentimientos informados en forma segura y ordenada según fecha de obtención.
- 1.5. En los casos en que la toma de muestra corresponde a pacientes con orden de su médico tratante para apoyo al diagnóstico y no como parte de un estudio, si el paciente decide no firmar el consentimiento informado, la muestra deber ser obtenida, procesada y archivada según conforme los procedimientos estándares, pero no debe ser usada como parte de ningún estudio o publicación.
- 1.6. En el caso de pacientes que sí pertenecen a un estudio, entonces se tomará la muestra siempre y cuando el paciente haya aceptado participar del estudio y haya firmado el consentimiento informado respectivo.

##### 2. Flebotomía o venopunción

- 2.1. La persona responsable de la toma de muestra verificará la existencia de todos los insumos necesarios: tubos, agujas, guantes, alcohol yodado, torundas, ligadura, etc.
- 2.2. Esta persona se lavará las manos cuidadosamente y se colocará los guantes. **Deberá usar mascarilla, careta protectora y bata descartable.**
- 2.3. Colocar el identificador de la muestra en el tubo de extracción a ser usado, de preferencia tanto el código de la muestra como el nombre y primer apellido del paciente y la fecha de toma.
- 2.4. Palpar y ubicar la vena en el brazo del paciente, de preferencia en la fosa cubital y en el brazo que menos utiliza el paciente.
- 2.5. Limpiar cuidadosamente el área a ser punzada usando una torunda de alcohol humedecida con alcohol yodado.
- 2.6. Esperar a que el alcohol se evapore.
- 2.7. Colocar la ligadura para torniquete en el brazo 5 a 8 centímetros antes del lugar de la punción haciendo presión para conseguir una mayor exposición de la vena y su mejor visualización. El nudo del torniquete debe de ser fácil de desatar.
- 2.8. Ensamblar el equipo de toma de muestra enroscando el adaptador a la aguja (verificar que el sello de seguridad esté íntegro).
- 2.9. Introducir la aguja en un ángulo aproximado de 30° con respecto a la vena, cuidando que el corte en bisel sea observado por el operador (bisel hacia arriba).
- 2.10. Introducir el tubo dentro del adaptador presionando de tal forma que la parte posterior de la aguja penetre la tapa del tubo, evitando mover la aguja.
- 2.11. Verificar el llenado del tubo hasta la medida adecuada.
- 2.12. Retirar el tubo y colocarlo en la gradilla.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 16</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

- 2.13 Si es necesario repetir el procedimiento con otros tubos, porque así lo indica el estudio, entonces se deberá remitir al Manual de Procedimientos del estudio respectivo, el cual debe haber sido entregado y explicado al personal responsable de la toma de muestras con anterioridad.
  - 2.14 Si alguno de los tubos tiene algún aditivo tipo anticoagulante, agitar lentamente el tubo, volteándolo 180° por 6 ó 7 veces.
  - 2.15 Retirar el equipo de venopunción, presionando inmediatamente el área de punzado por unos segundos con una torunda de algodón seco.
  - 2.16 Descartar la aguja en el contenedor especial para agujas, leer punto 6 de este documento.
  - 2.17 Colocar esparadrapo, sólo si fuera solicitado por el paciente o si éste no pudiera sostener la torunda seca.
  - 2.18 Doblar el brazo del paciente y hacerle saber que tenía que mantener está posición haciendo presión sobre el área de punzado por aproximadamente 5 minutos.
  - 2.19 Asegurarse que el paciente se sienta bien antes de abandonar el área de toma de muestra.
- 3. Obtención y alicuotado del suero o plasma:**
- 3.1. Dejar reposar la muestra tomada por 30 a 60 minutos aproximadamente a temperatura ambiente antes de la centrifugación, en un lugar seguro.
  - 3.2. Centrifugar la muestra a 5000 rpm por 5 minutos aproximadamente.
  - 3.3. Verificar que el código de muestra del tubo corresponda a la de los viales previamente etiquetados.
  - 3.4. Transvasar el suero obtenido a dos viales haciendo uso de una pipeta graduada y evitando tocar el coágulo.
  - 3.5. Uno de los viales será almacenado inmediatamente a -20°C. El segundo vial es entregado al Laboratorio para su procesamiento o almacenado a 4°C hasta su procesamiento, posteriormente se archivará también a -20°C en otro congelador diferente al del primer vial.
  - 3.6. El tubo será almacenado a 4°C para realizar el control de calidad y hasta que se haya validado el resultado de dicha muestra.
  - 3.7. Una vez validado el resultado y realizado el control de calidad y si la cantidad de muestra en el tubo lo permitiera, hacer un tercer vial y almacenarlo a -20°C en un congelador diferente a los que contienen el primer y segundo juego.
  - 3.8. Una vez validado el resultado y realizado el control de calidad, descartar el tubo en un contenedor con desinfectante o hipoclorito de sodio al 10% asegurándose que éste entre en contacto con el coágulo. El proceso de descarte de tubos está más detalladamente explicado en el punto 6 de este documento.
- 4. Toma de muestra de sangre por punción de dedo o “fingerprick”:**
- 4.1. En el caso que hubiera imposibilidad de tomar la muestra de sangre por venopunción, se optará por hacerlo a través de una punción de dedo. Otras veces la muestra llegará a nuestro laboratorio ya tomada en papel filtro.
  - 4.2. Para este tipo de muestra de sangre se aplican también los criterios antes mencionados en la obtención del consentimiento informado.
  - 4.3. La persona responsable de la toma de muestra verificará la existencia de todos los insumos necesarios: lancetas, papel filtro, guantes, alcohol yodado, torundas, etc.
  - 4.4. Esta persona se lavará las manos cuidadosamente y se colocará los guantes.





- 4.5. Colocar el identificador de la muestra en el papel filtro a ser usado, de preferencia tanto el código de la muestra como el nombre y primer apellido del paciente y la fecha de toma.
- 4.6. Escoger la mano que menos utiliza el paciente (si es zurdo se escogerá la mano derecha; si es diestro, la izquierda)
- 4.7. Dejar el brazo colgado hacia abajo por uno o dos minutos.
- 4.8. Escoger de preferencia el dedo medio o anular (son los menos usados).
- 4.9. Limpiar el dedo escogido con alcohol yodado.
- 4.10. Presionar el dedo permitiendo que las partes laterales de la yema queden expuestas (son las áreas de menor contacto).
- 4.11. Introducir la lanceta en una de estas regiones laterales.
- 4.12. Usar un trozo de papel para absorber la sangre hasta que ésta empape toda el área previamente delimitada para un volumen de sangre calculado (100 uL).
- 4.13. De ser posible tomar tres muestras por cada paciente.
- 4.14. Con un pedazo de algodón seco presionar el lugar del hincón hasta confirmar que ya no hay salida de sangre.
- 4.15. Colocar inmediatamente cada trozo de papel empapado en sangre (con aproximadamente 100 uL) en un vial conteniendo 900 ul. de buffer diluyente.
- 4.16. Cerrar el vial.
- 4.17. Agitar fuertemente, si fuera posible usar un vortex.
- 4.18. Mantener la muestra de preferencia a 4°C, de no ser posible a temperatura ambiente, por unos días, hasta su llegada al laboratorio en donde deberá ser archivada a -20°C.
- 4.19. Antes de ser usada para cualquier técnica de inmunodiagnóstico se deberá sonicar (sonicador de lavado) por 15 minutos evitando que la temperatura exceda los 56°C.

#### **5. Muestras recibidas de otros laboratorios:**

- 5.1. Para todas las muestras no tomadas en el Laboratorio de Cisticercosis INCN
- 5.2. Verificar el lugar de donde proviene la muestra, nombre y datos completos del paciente.
- 5.3. Verificar la fecha de toma de muestra y las condiciones de guardado hasta el momento de la entrega. De confirmarse que la muestra ha sido sometida a calor mayor de 56°C o ha sido mantenida sin refrigeración por más de 7 días a T° ambiente, se descartará dicha muestra y se solicitará una nueva muestra.
- 5.4. Verificar si la muestra fue tomada con algún aditivo, por ejemplo; un anticoagulante, para determinar el subtipo de muestra.
- 5.5. Rotular el tubo o vial si fuera necesario.
- 5.6. Para las muestras de sangre total recibidas de otros laboratorios generalmente en tubos de extracción, se procederá según lo descrito en los puntos 2 y 3.
- 5.7. Para las muestras de sangre, suero o plasma recibidos en papel filtro se procederá según lo descrito en el punto 4.
- 5.8. Para las muestras de suero o plasma recibidas se deberá proceder según los puntos descrito anteriormente.

#### **6. Descarte y desinfección de la muestra:**

- 6.1. Todas las agujas utilizadas en la venopunción deben ser colocadas en el contenedor de agujas sin ser tapadas o dobladas. El mayor riesgo de contaminación en este tipo de procedimientos se da al pincharse con la aguja, en el momento en que esta es tapada o doblada antes de su descarte.
- 6.2. El contenedor agujas y material punzocortante debe ser específicamente para estos fines, con paredes gruesas, boca

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 18</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

ancha, debe contar con el signo visible de riesgo biológico, se debe llenar sólo hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, luego debe ser sellado y entregado al personal responsable de limpieza.



- 6.3. Los tubos o viales donde se colectó o archivó temporalmente la muestra, una vez completada la validación y control de calidad del resultado, serán colocados dentro del contenedor de bioseguridad conteniendo hipoclorito de sodio al 10%. Asegurarse que el coágulo entre en contacto con el hipoclorito, se debe llenar sólo hasta  $\frac{3}{4}$  de su capacidad, luego debe ser sellado y entregado al personal responsable de limpieza.
- 6.4. Las torundas de algodón utilizadas se deberán colocar también en el contenedor de bioseguridad conteniendo hipoclorito de sodio al 10%.
- 6.5. Cualquier derrame o contaminación con la muestra deberá ser inmediatamente desinfectado usando hipoclorito de sodio al 10% sobre la muestra, dejándolo actuar por 10 minutos para luego limpiar el área cuidadosamente. Informar inmediatamente al responsable del Laboratorio.

#### **7. Cómo enviar muestras de sangre al Laboratorio de Cisticercosis:**

- 7.1. Enviar de 1 a 2 ml de suero (el uso de plasma muchas veces no da resultados confiables).
- 7.2. El envío de la muestra no tiene que ser necesariamente refrigerado, la muestra puede tener de 1 a 7 días sin refrigeración sin alterar su resultado (para IgG que es lo que nosotros detectamos). La muestra no debe ser sometida a calor.
- 7.3. Puede usarse un courier para envío de las muestras, estos toman máximo 2 días para hacérselas llegar.
- 7.4. Se debe remitir a: Dr. Héctor H. García Lescano Laboratorio de Cisticercosis - Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas. Jr. Ancash 1271, Barrios Altos, Lima. Tlf: (01) 3288589.
- 7.5. Asegurarse que la muestra venga bien cerrada, para evitar derrames o contaminaciones. Sellar con parafilm o en todo caso poner cada muestra en una bolsita cerrada.
- 7.6. Debe consignarse: nombres y apellidos, edad, sexo y de ser posible el No. de DNI del paciente, así como también la fecha de toma de muestra.
- 7.7. Si envían más de una muestra asegurarse que sean identificables.
- 7.8. El costo de la prueba deben de ser abonados a la cuenta en soles N° 00-068-368480 que tiene el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas en el Banco de la Nación. Hay también un costo de transferencia que cobra el mismo Banco para los pagos hechos en provincia.
- 7.9. Dentro del paquete, enviar el voucher o boleta original emitida por el Banco, este es un requisito solicitado por nuestra institución con fines contables, además de la orden o indicación médica indicando el tipo de prueba solicitada (sólo brindamos Western blot para cisticercosis e hidatidosis).
- 7.10. Los resultados son enviados entre el segundo y tercer día de haberse recibido la muestra, vía e-mail, por lo que deberán enviar la dirección de correo electrónico, legible, del laboratorio o médico responsable o si fuera el caso del mismo paciente.

#### **8. Control de calidad:**

- 8.1. Al final del día la persona responsable de la toma de muestra cotejará el número de pacientes y muestras registradas en sus cuadernos de ingreso de muestras contra el físico de las muestras (tubos).

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 19</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

- 8.2. Posteriormente cotejará estas mismas muestras físicas contra las órdenes de trabajo generadas por el sistema con la persona encargada de dicha generación de órdenes.
- 8.3. Después de que la verificación sea correcta, se procede a la entrega de las muestras a los responsables de archivo (primer vial) y de procesamiento (segundo vial).
- 8.4. Durante el procesamiento de las muestras en el laboratorio, el 10% de éstas serán procesadas nuevamente bajo las mismas condiciones, tomando la cantidad correspondiente del tubo original en el que se tomó la muestra. Control de calidad de transvase o alicuotado.

#### 8.2.4. TECNICA DE WESTERN BLOT

##### 1. Introducción

Esta técnica permite observar la reacción de los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes frente al antígeno *T. solium* y antígeno de *E. granulosus*.

Los componentes proteicos de los parásitos, son separados por electroforesis y después transferidos a una membrana de nitrocelulosa, la membrana es incubada con el suero problema y si el suero tiene anticuerpos se origina un producto insoluble que precipita formando bandas en las zonas de las proteínas antigénicas.

##### 2. Objetivo

Describir y detallar en la guía de procedimientos operacionales los pasos como la producción de tiras reactivas y todo el proceso de Electroforesis y Transferencia por Western Blot tanto para Cisticercosis e Hidatidosis.

##### 3. Materiales y Equipos

- Antígeno para Cisticercosis -Cysti LLGP. TS-11222<sup>a</sup>
- Antígeno para Hidatidosis Líquido Hidatídico de 48 horas dializado PG-15000
- Buffer soluciones para Western blot
- PH – metro
- Cámara para geles
- Cámara de electroforesis
- Cámara de transferencia
- Fuente de poder
- Stirrer magnetic
- Gradienten Mixer Gel
- Sistema de refrigeración
- Shaker bidireccional
- Balanza analítica
- Aire acondicionado
- Baño de Refrigeración
- Bomba de vacío
- Bomba hidroneumática + Tanque rojo 24L 1.5 bar 0,6 Hp L/min 8/40
- Bomba peristáltica Drive Masterflex L/C 6-600 rpm
- Cortador de tiras Strip Cutter 2.5 MM width strip Potenciometro
- Extractor Hélico Centrifugo 350 W campana Extractora
- Fuente de poder
- Gradient Mixer Gel
- Magnetic Filter Funnel
- Microplates Washer CappWash 8 Channel Washer for 95-well
- Milli-RO
- Milli-Q
- Estabilizadores de Tensión 10K VA
- Microondas
- Refrigeradora
- Congeladora
- Protan BA83 pure Nitrocelulose 3MX30CM 0.2UM

Versión : 1.0



Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.

- Tris ultra puro (balde x 5kg)
- Acrilamida (frasco x 1kg)
- BIS Acrilamida (frasco x 60gr)
- 3,3"-Diaminobenzidine tetra-hydrochloride (25G)
- Electroforesis Purity Reagent Boric Acid (500g)
- Sodium Dodecil Sulfate (100g)
- Amonium Persulfate (10g)
- Temed (frasco x 5ml)
- Methanol (5l)
- Isobutanol(2.5L)
- Leche descremada en polvo
- Peróxido de Hidrógeno 30%
- Conjugado anti IgG Humano
- Lejía al 10%
- Tubos microcentrífugue 1.5ml(1000und)
- TWEEN 20 (x 500ml)
- Gel Blot Paper (paquete x 100)
- Tips Antígeno
- TIPS 0.5-10UL (1000und)
- TIPS 1000UL BLUE AXIGEN T-1000-B (1000und)
- TIPS 200UL (1000und)
- Etiquetas de poliester (rollo x 500)
- Papel filtro
- Gas
- Guantes
- Mascarillas
- Contenedor de desechos con bioseguridad
- Material de vidrio
- Placas de Incubación
- Micas de plástico transparente para colocar las tiras reactivas
- Cinta scotch transparente
- Detergente para el lavado de material
- Plumones indelebles para el rotulado de las tiras
- Bolsas de plástico para el almacenaje de las micas
- Formato de Incubación
- Cuadernos para el registro de resultados



#### 4. Procedimiento

##### 1. Preparación de Geles de poliacrilamida

- 1.1. Limpiar los vidrios y separadores con alcohol y gasa y luego con papel toalla (asegurarse que no queden pelusas sobre los vidrios).
- 1.2. Descartar cualquier vidrio que tenga adherido cualquier tipo de suciedad o ralladuras muy grandes.
- 1.3. Asegurarse que la cámara no tenga fugas, Secar la cámara.
- 1.4. Armar los sándwiches usando dos vidrios y dos separadores de 0.75mm de espesor, de tal forma que los vidrios queden uno frente a otro y los separadores queden entre los extremos de los vidrios en forma vertical. Asegurarse que los bordes inferiores de los vidrios y separadores estén totalmente alineados.
- 1.5. Sellar los extremos del sándwich con PTFE Extruded Film tape 5490 HD.
- 1.6. Colocar los sándwiches uno tras otro dentro de la cámara. Si quedara alguno de los extremos con espacios muy grandes, llenar estos con láminas de teflón o acrílico para que los sándwiches queden compactos.
- 1.7. Los sándwiches quedarán enumerados en forma correlativa ascendente empezando del que está más cerca de la tapa. Esto se hará con ayuda de un marcador con punta de diamante.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>		Pág. 21
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		



- 1.8. Asegurarse que el cordón de jebe este bien colocado en la ranura de la cámara. Enjuagar dicho cordón después de cada uso, colocar silicona en spray y limpiar con papel toalla por lo menos 1 vez al mes.
- 1.9. Colocar la tapa y cerrar los tornillos alternadamente en cruz hasta conseguir que la presión sea uniforme sobre toda la cámara, esto se observará por la presión ejercida sobre el cordón. Se cubre la cámara con parafilm.
- 1.10. Conectar la manguera que unirá la salida del formador de geles de gradiente (2 cilindros con sistema de vasos comunicantes y agitación constante en uno de ellos) a la entrada de la cámara de sándwiches, previamente dicha manguera es conectada a dos llaves de triple vía a las cuales se les acopla dos jeringas que son para el isobutanol y el pushing, inmediatamente después la manguera pasa a través del cabezal de una bomba peristáltica.
- 1.11. Dejar pasar 3mL de isobutanol saturado (isobutanol-agua 1:1), desconectando la manguera de la entrada de la cámara, de esta manera uno asegura la eliminación de cualquier sustancia extraña contenida dentro de las mangueras.
- 1.12. Conectar la manguera a la cámara y dejar pasar 25 mL de isobutanol saturado a una velocidad de 2 en la bomba Masterflex, modelo 77521-47, asegurándose de que se distribuya uniformemente en toda la base de la cámara pues este le dará el nivel a los geles.
- 1.13. Todos los reactivos deben tener por lo menos 24 horas de preparados, deben haber sido mantenidos en refrigeración, además de haber sido previamente filtrados y envasados en frascos totalmente limpios.
- 1.14. Los reactivos deben ser sacados 3 horas antes de su uso para que tomen temperatura ambiente y estén al pH adecuado.
- 1.15. Preparar dos soluciones de concentraciones diferentes de acrylamida y bisacrilamida (5% y 25%). Estas dos soluciones son colocadas por separados dentro del sistema de vasos comunicantes. El volumen total calculado para el número de geles que se va a producir es dividido en dos, mitad para la solución de menor concentración y mitad para la de mayor concentración.
- 1.16. Colocar en el primer cilindro la solución del 25%, se abre la llave circular hasta que pase una gota, luego se cierra y se coloca la otra concentración del 5%, luego se tapa a presión con la cuchilla mezcladora verificando que las llaves de triple vía estén abiertas permitiendo el flujo del gel hacia la cámara.
- 1.17. Cilindro que contiene la solución de menor concentración y que se halla más cerca de la cámara de geles está siempre en movimiento mediante una cuchilla mezcladora llamada (Gradient Mixer GM-1) para conseguir la mezcla con la solución de mayor concentración que está en constante flujo.
- 1.18. Activar nuevamente la bomba Masterflex modelo 77521-47 a una velocidad de 2 y dejar que pase la solución de menor concentración, asegurándose que no haya burbujas dentro de las mangueras, hasta 1. Observar que la solución de 5% marque 150 mL. Luego se abre la llave circular negra unos 360° aumentando la velocidad de la bomba Masterflex, modelo 77521-47 a 4.
- 1.19. Este paso es muy importante pues inicia la formación del gradiente de concentración; asegurarse que el cilindro de menor concentración esté en agitación constante. Durante todo este proceso, observar que el flujo sea constante y el descenso de ambos volúmenes sean casi equivalentes, si esto no sucediera, con la ayuda de una micropipeta de 1 mL expulsar la posible

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 22</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

burbuja que estuviera obstruyendo el sistema de vasos comunicantes.

- 1.20. Dejar que pase inmediatamente, después que terminó de pasar el gel y evitando la presencia de burbujas en la manguera, 15 ml de la solución de empuje (pushing). Observar que esta solución se distribuya uniformemente formando un colchón. Apagar la bomba, cerrar la llave de la cámara de geles y desconectar todo el sistema.
  - 1.21. Observar si ocurren fugas, de ser así intentar sellar con silicona en rasa o vaselina si no hubiera la primera.
  - 1.22. Dejar gelificar toda la noche a temperatura ambiente antes de desmontar la cámara. La temperatura óptima de gelificación va de 23°C a 25°C.
  - 1.23. Lavar los geles con abundante alcohol etílico y agua destilada hasta que el olor del isobutanol desaparezca.
  - 1.24. Guardar los geles en bolsas Ziplog con agua destilada o resolving gel buffer diluido 1:10 en agua destilada para evitar la deshidratación del gel, en refrigeración.
  - 1.25. Los vidrios y separadores inmediatamente después de su uso lavarlos con detergente y esponja verde por ambos lados, enjuagarlos con abundante agua de caño, enjuagarlos con agua destilada (no dejarlos remojar con detergente).
  - 1.26. Poner a secar los vidrios y separadores, guardarlos una vez que estén secos (no dejarlos en la canastilla).
  - 1.27. La cámara después de su uso deberá ser enjuagada con abundante agua de caño y luego con agua destilada, asegurarse que el canal inferior este limpio.
  - 1.28. Los cilindros y mangueras del sistema de elaboración de geles de gradiente después de su uso deberán ser enjuagados con abundante agua de caño y luego con agua destilada, asegurarse que no quede agua dentro de las mangueras. Poner a secar y luego guardar en lugar seguro.
  - 1.29. Antes de su uso enjuagar los geles con agua destilada.
  - 1.30. Secar el borde superior del gel evitando dañar el gel usando papel filtro altamente poroso.
  - 1.31. Colocar el peine de teflón en forma recta y centrada.
  - 1.32. Llenar el espacio libre con stacking gel buffer usando una jeringa con aguja nº 23G evitando la formación de burbujas, dejar gelificar por lo menos 15 minutos.
- 2. Corrida Electroforética**
- 2.1. Armar la cámara de electroforesis con 2 sándwiches simétricamente colocados y sellando con silicona líquida los extremos entre el sándwich y los gaskets para evitar la fuga del upper buffer.
  - 2.2. En la cámara de electroforesis colocar 4 litros de lower buffer, verificar su uso (no más de 5 veces). Una vez culminado el uso lavar la cámara y ponerla a secar.
  - 2.3. Sacar el Antígeno de Cisticercosis (Cysti LLGP. TS-11222) o el Antígeno de Hidatidosis (Líquido Hidatídico de 48 horas dializado PG-15000) unos 20 minutos antes de su uso a temperatura ambiente, agregar SDS al 10% (1 ul por cada 100 ul de Ag) y mezclar en vórtex.
  - 2.4. Calentar a 90°C por 5 minutos, encender el baño maría 1 hora antes para alcanzar la temperatura deseada.
  - 2.5. Colocar el upper buffer en el espacio inferior de la cámara ya armada cubriendo todo el sándwich.
  - 2.6. Para realizar corrida electroforética con Antígeno de Cisticercosis (Cysti LLGP. TS-11222), agregar 150ul/gel sobre el





 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p>INCN</p>	<p>Pág. 23</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

gel en forma continua y con mucho cuidado, el upper buffer no debe estar en movimiento. Observar que el antígeno se distribuya uniformemente sobre la superficie del gel.

- 2.7. Para realizar corrida electroforética con Antígeno de Hidatidosis de (Líquido Hidatídico de 48 horas dializado PG-15000), agregar 300ul/gel sobre el gel en forma continua y con mucho cuidado como en el paso anterior.
- 2.8. Prender el sistema de enfriamiento con 30 minutos de anticipación o hasta que alcance la temperatura de 7-10° C. Registrar la temperatura de inicio y termino de la electroforesis.
- 2.9. Al inicio de la corrida electroforética se aplican 12.5 mA/gel por 15 minutos para alinear el Ag en el stacking gel, una vez alineado el amperaje se aumenta a 25 mA/gel para el resolving gel, el tiempo que demora la electroforesis es de 40 a 50 minutos aproximadamente. (Esto es aplicable también al sistema Miniprotean de BIORAD pero variando a 5 mA y luego de 15-20 mA por gel). Registrar el voltaje de inicio y fin de la electroforesis.
- 2.10. Terminada la electroforesis, sacar cuidadosamente los geles evitando que el upper buffer se derrame dentro de la cámara y se mezcle con el lower.
- 2.11. Lavar el soporte de los geles con abundante agua de caño y luego con agua destilada, secar y guardar. Los gaskets pueden ser sacados lavados con detergente enjuagados muy bien y cubiertos con silicona en spray y luego limpiados con papel toalla (esto deberá hacerse sólo 1 ó 2 veces al mes).



### 3. Transferencia

- 3.1. Los geles inmediatamente obtenidos después de una óptima corrida electroforética (si esto no ha ocurrido, descartar el gel) son sacados del sándwich formado por los vidrios haciendo presión entre los dos vidrios usando una palanca.
- 3.2. Colocar el gel resuelto sobre la membrana de nitrocelulosa (a la que se le ha dibujado una línea de marcación en uno de los extremos) que a su vez se halla sobre un papel filtro grueso, tapar el gel con otro papel filtro grueso embebido en buffer de transferencia a manera de sándwich. Presionar este sándwich en un sólo sentido con una especie de rodillo para conseguir la unión del gel con el papel de nitrocelulosa evitando la presencia de burbujas pues estas impiden la transferencia. Todo este procedimiento se hace dentro de un recipiente lleno de buffer de transferencia.
- 3.3. Toma este "sándwich" y se coloca dentro de un sostenedor que tiene una esponja a cada lado, cerrar cuidadosamente el sostenedor el cual permite mantener presionado este sándwich durante todo este procedimiento y se coloca dentro de un tanque lleno de buffer de transferencia. Se coloca el sostenedor en el tanque de transferencia cuidando que la corriente eléctrica vaya en dirección del gel a la membrana.
- 3.4. La fuente de poder se gradúa en 2A o 2.5A según la potencia de cada fuente y conectado a un sistema de enfriamiento (la temperatura nunca debe exceder los 56°C). El voltaje se pone al máximo. Registrar el voltaje de inicio y término de la transferencia.
- 3.5. El sistema de enfriamiento debe ser encendido 45 minutos antes de iniciar la transferencia hasta esperar que llegue a una temperatura de 7°C. Registrar la temperatura de inicio y término de la transferencia.
- 3.6. El proceso de transferencia dura aproximadamente 2 horas. Una vez terminada la transferencia debe observarse una capa delgada



 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 24</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

- de espuma sobre el buffer de transferencia, si ésta no se observa o es excesiva o no es de color blanco, debe anotarse.
- 3.7. Terminada la transferencia se debe recuperar el buffer usado hasta por 5 veces.
  - 3.8. Eliminar los geles con mucho cuidado de no dañar la nitrocelulosa y al contenedor de productos de laboratorio.
  - 3.9. Lavar la nitrocelulosa con PBS-Tween 0.3% 3 veces, dejar lavando en agitación toda la noche con PBS-Tween 0.3% en refrigeración y con el lado transferido hacia abajo. Al día siguiente enjuagar 5 veces con PBS y finalmente limpiar con algodón embebido en PBS los restos de gel que puedan haber quedado sobre la membrana de nitrocelulosa antes de cortar.
  - 3.10. Para hacer uso del cortador Inotech, debe secarse bien la nitrocelulosa entre 2 papeles filtros gruesos con mucho cuidado de no dañarla.
  - 3.11. Sobre el cortador y en la primera línea marcada se colocarán unos 4 a 5 cm de la membrana plástica y se sujetarán a los lados con cinta scotch. Colocar sobre la segunda línea marcada la nitrocelulosa seca también sostenida con cinta scotch y con la línea de marcación hacia delante (al lado contrario de la posición original de la cuchilla). Asegurarse que las cuchillas estén en su posición original. Cerrar y asegurar los dos brazos, coger las asas laterales de la cuchilla y jalar hacia delante.
  - 3.12. Una vez cortada la nitrocelulosa, cortar el lado que tiene la cinta scotch. Colocar la nitrocelulosa entre papeles filtros gruesos y embeber en PBS.
  - 3.13. Retirar 2 tiras laterales y 3 centrales para el control de calidad.
  - 3.14. Archivar a -20°C hasta la verificación del control de calidad. Si pasa dicho control se almacenará a -70°C hasta su uso.
  - 3.15. El lavado de la cámara de transferencia se hará inmediatamente terminada la transferencia, con agua con detergente y alguna esponja suave, el electrodo de acero inoxidable puede ser lavado cada cierto tiempo con esponjita verde. Enjuagar con abundante agua de caño y enjuagar muy bien con agua destilada.
  - 3.16. Las esponjas de transferencia deben ser lavadas inmediatamente terminada la transferencia con abundante agua de caño, luego deben ser lavadas 3 veces con agua de caño hervida muy caliente, estos lavados deben asegurar que cada esponja se lave individualmente para asegurarnos que todas se laven bien. En el caso del lavado con agua hervida evitar que el sedimento del hervidor caiga sobre las esponjas, enjuagando el hervidor con cierta frecuencia y dejando un poco de agua residual en el hervidor después de cada lavado.
  - 3.17. Enjuagar 5 veces las esponjas con agua destilada del Milli-Q.
  - 3.18. Escurrir las esponjas y ponerlas a secar, guardarlas individualmente ya secas en el cuarto frío.
- 4. Reacción Inmunoenzimática (SUERO Y LCR)**
- 4.1. **INCUBACIÓN:**
    - 4.1.1. Verificar que las placas de incubación estén bien lavadas y secas.
    - 4.1.2. Limpiar con alcohol tanto por la parte exterior como interior, dejar secar.
    - 4.1.3. Enumerar en forma correlativa ascendente y siempre del mismo lado de las placas.
    - 4.1.4. Distinguir los grupos de muestras a incubar tanto para reconocer el conjugado que debe ser agregado como para saber en qué orden serán sacadas y enumeradas



 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 25</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

- las tiras (esto puede hacerse en la placa misma o en las tapas correspondientes).
- 4.1.5. Llenar el formato de incubación con todos los datos necesarios.
  - 4.1.6. Preparar PBS-Tween leche al 0.5%, mezclar por lo menos por 5 minutos. Mantenerlo tapado con parafilm para evitar cualquier contaminación.
  - 4.1.7. Dispensar el bloqueante, agregar la muestra y la tira para Cisticercosis o Hidatidosis.
  - 4.1.8. Mantener la ubicación de la muestras de acuerdo al formato de incubación.
  - 4.1.9. Marcar en el formato de incubación el inicio de la colocación de cada slab, escribiendo número y fecha del slab.
  - 4.1.10. Tomar aquellas tiras cuyo control de calidad haya sido óptimo, Sacar las placas de refrigeración para terminar el proceso a temperatura ambiente.
  - 4.1.11. Dejar pasar antes de iniciar los lavados una cantidad de PBS- Tween o PBS solo, según corresponda, por el sistema de lavado para enjuagarlo.
  - 4.1.12. Primer lavado 3 veces con PBS-Tween 0.3% usando un sistema manual de lavado y dejando 5 minutos agitando en el shaker entre cada lavado.
  - 4.1.13. Agregar el conjugado a la dilución que corresponda (para sueros humanos: 1:10000; dejar incubando en movimiento por 2 horas a temperatura ambiente).
  - 4.1.14. Realizar un segundo lavado similar al primero pero con PBS-Tween 0.3% a temperatura ambiente por 3 veces y luego con PBS solo 2 veces más.
  - 4.1.15. Preparar minutos antes la solución de coloración en PBS con peróxido de hidrógeno al 30% y diaminobencidina (DAB) a partir de una solución stock de DAB en PBS 50 mg/ml (que puede ser preparada con mucho tiempo de anticipación y mantenida a -20°C).
  - 4.1.16. Colocar 500 ul de la solución de coloración en cada canaleta y se deja reaccionar más o menos por 10 minutos, luego de los cuales se procede a lavar con agua corriente por 10 veces.
  - 4.1.17. Empezar por los controles para verificar que la reacción esté ocurriendo, inmediatamente continuar con las muestras, pero siempre dejar un tiempo mínimo de 10 min. Si los controles tuvieron problemas de revelado evaluar rápidamente cuál es el problema, de ser el conjugado se debe agregar el conjugado indicado y a la dilución correcta e incubar nuevamente por 2 horas; de no ser el conjugado, preparar nuevo DAB y probar.
  - 4.1.18. Verificar correlatividad y orientación de tiras y placas antes de sacar las tiras, asegurarse que éstas mantengan el orden del formato de incubación.
  - 4.1.19. Sacar con ayuda de una pinza las tiras una a una y colocarlas consecutivamente una junto a la otra sobre alguna membrana o mica transparente. Alinearlas con ayuda de una regla para que se pueda seguir fácilmente el patrón de corrida de las bandas. Asegurarse de que de cada placa se saquen 8 tiras. Asegurarse que no quede alguna tira debajo de otra.

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p align="center"><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p align="center"><b>INCN</b></p>	<p align="right">Pág. 26</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		



- 4.1.20. Pegar sobre el borde superior de las tiras alineadas una cinta scotch transparente cuidando de no cubrir bandas de importancia diagnóstica.
- 4.1.21. Limpiar con ayuda de un papel toalla mojado en agua de caño, limpiar cuidadosamente las tiras, evitando dañarlas o que pierdan su alineación.
- 4.1.22. Poner a secar las tiras.
- 4.1.23. Codificar cada grupo de tiras colocando: fecha de incubación, códigos correlativos de cada muestra incubada según formato, tipo de muestra (suero humano, LCR, etc.)
- 4.1.24. Verificar que no quede ninguna tira en las placas antes que éstas sean lavadas.
- 4.1.25. Colocar las placas en lejía al 10% asegurándose que todas queden sumergidas en esta solución. Después de 24 horas estas placas pueden ser lavadas y enjuagadas (según lo indica dicho protocolo).
- 4.1.26. Lavar el equipo de lavado manual debe ser lavado una vez por semana usando algún sistema de presión y usando sólo agua destilada (Milli-Q).
- 4.1.27. Repetición de las Incubaciones:  
La repetición de incubación de las muestras será de la siguiente manera: si son muestras humanas de la rutina del laboratorio urgentes deberán incubarse por duplicado y en slabs diferentes (para estos casos son útiles las tiras sobrantes de otras repeticiones que hayan dado buenos resultados en su primera incubación).
- 4.1.28. Controles de calidad:  
Deberán incubarse 5 tiras (3 centrales y una de cada extremo) de cada slab usado con un suero humano control positivo fuerte, un control positivo débil y un control negativo para las tiras centrales, los extremos se evaluarán con el pool positivo débil. Estas 5 tiras se incubarán en la misma placa y siguiendo un orden constante.

El control positivo fuerte deberá presentar todas las bandas del Ag, el control positivo débil deberá ser siempre positivo al número de bandas que suela presentar (en el caso de WBCY 3 bandas por ejemplo), el control negativo no deberá presentar

Control de calidad de los Slab: Repetir la incubación de una tira central y una de cada extremo con pool positivo débil al final del mes y antes de escoger cuáles slabs quedan y cuáles se descartan, si es que alguno de estos controles no salió bien. De no observarse las bandas lo indica el control usado se descartará dicho slab.

Control de calidad de alícuotado: incubar el 10% de todas las muestras de la rutina diaria (se escoge un número al azar del 0 al 9 y se toman todas aquellas que terminen en ese dígito). La incubación se hace con las muestras del día y a partir del tubo de muestra original en el que se toma o llega la muestra.

Control de calidad de incubación: incubación del 10% de las muestras de la rutina diaria (se escoge un número al azar del 0 al 9 y se toman todas aquellas que terminen

 <p>Ministerio de Salud Personas que atendemos personas</p>	<p><b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS</b></p>	 <p><b>INCN</b></p>	<p>Pág. 27</p>
<p>Versión : 1.0</p>	<p>Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.</p>		

en ese dígito). La incubación se hace con las muestras del día y a partir del mismo vial que se usó para la incubación original.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Introducción

Dentro del diagnóstico clínico de rutina o dentro de cualquier estudio, la obtención de resultados de los exámenes realizados es un procedimiento de mucho cuidado ya que necesita una adecuada capacitación, preparación y atención a ciertos requisitos por el personal a cargo. Los resultados de Cisticercosis o Hidatidosis son procesados en la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado del INCN, Lima.

### 4.2.2. Objetivo

Realizar la entrega de resultados, en óptimas condiciones al paciente para ser evaluados por el Médico Tratante.

### 4.2.3. Materiales y Equipos



- Computadora
- Monitor
- Papel bond A4
- Lapiceros
- Archivadores de palanca tamaño oficio
- Archivadores de palanca lomo ancho A4
- Porta lapiceros
- Cuadernos A4
- Cartucho color negro
- Chinchas metálicas
- Clip mariposa gigante
- Perforador

### 4.2.4. Procedimiento

- 1 Responsable de la atención de pacientes
  - 1.1. El Biólogo, Médico – Patólogo es el encargado de la buena atención de los pacientes que ingresan a la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.
2. Responsable de la supervisión de toma y procesamientos de muestras.
  - 2.1. El Biólogo, Médico – patólogo se encarga de hacer cumplir los procedimientos Operacionales Estándares aquí descritos.
3. Responsable de la firma de resultados de la prueba de western blot Cisticercosis e Hidatidosis.
  - 3.1. El Biólogo, Médico – Patólogo es el encargado de firmar los resultados de Western blot para Cisticercosis e Hidatidosis.

## VIII. RECOMENDACIONES



- Dentro del diagnóstico clínico de rutina del western blot, la colección de muestras de sangre, obtención de tiras reactivas y el procesamiento de las muestra son procesos claves.
- El personal debe tener una adecuada preparación y atención a ciertos requisitos de seguridad para la manipulación y confiabilidad de los resultados, **y seguir las medidas de protección personal adecuadas al escenario actual de pandemia.**
- El Jefe de cada laboratorio será el encargado del cumplimiento de los procedimientos mencionados en este Manual de Procedimientos Estándares de la Guía Técnica.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>		<b>Pág. 28</b>
<b>Versión : 1.0</b>	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		

- Se necesita contar con herramientas para implementar acciones o proyectos de mejora en la técnica para lo cual se requiere de decisión de gestión para impulsar y obtener recursos para la compra de insumos.

## **IX. BIBLIOGRAFIA.**

1. Del Brutto OH, Sotelo J. Etiopatogenia de la neurocisticercosis. Rev Ecuat Neurol 1993; 2: 22-32
2. H. H. Garcia, M. Martinez, R. Gilman, G. Herrera, V. C. Tsang, J. B. Pilcher, F. Diaz, M. Verastegui, C. Gallo, M. Porras, and et al., 'Diagnosis of Cysticercosis in Endemic Regions. The Cysticercosis Working Group in Peru', Lancet, 338 (1991), 549-51.
3. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Serológico de la Hidatidosis Humana. Serie de Normas Técnicas N° 22. 1997.

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLOGICAS</b>		Pág. 29
Versión : 1.0	Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.		

4. Náquira C, Bullon F, Balvin G, Reyes N, Sánchez E. Epidemiología de la hidatidosis en el Perú. En: Anales del Seminario Nacional de Zoonosis y Enfermedades de Alimentación Alimentaria. Ministerio de Salud. 1989. p. 122-34. 11
5. Organización panamericana de salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, OPS; 1986. (Publicación Científica 503).
6. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989;159

## X. ANEXOS

Versión : 1.0

Guía Técnica de Procedimientos para la evaluación de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para el diagnóstico de Cisticercosis, Hidatidosis mediante la Técnica de Western Blot de la Unidad de Neurocisticercosis y Laboratorio Especializado.

