ELI.H.A TOXO

Serodiagnóstico de la Toxoplasmosis por hemaglutinación indirecta

120 pruebas

(Ref. 66610)

8000160-ES-2025-09_V5

Para uso en diagnóstico in vitro, sólo para uso profesional. CE 0459

1 – FINALIDAD

La prueba **ELI.H.A TOXO** permite la determinación semicuantitativa de anticuerpos séricos dirigidos contra *Toxoplasma gondii* por hemaglutinación indirecta. El kit permite realizar 120 pruebas o 20 reacciones de 6 diluciones.

2 – INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una infección parasitaria cuyo agente causal es el protozoo *Toxoplasma gondii*. Benigno o asintomático en la gran mayoría de los casos, representa un riesgo grave para las mujeres embarazadas seronegativas, los recién nacidos y los pacientes con un sistema inmunológico débil.
Durante la respuesta inmune, el individuo desarrolla varios tipos de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos toxoplasmáticos. El porcentaje relativo de cada uno de estos anticuerpos en el suero puede variar de un sujeto a otro y dentro del mismo sujeto dependiendo de la etapa de desarrollo de la infección (1,2,3,4).

3 – PRINCIPIO

ELI.H.A TOXO se basa en el principio de hemaglutinación indirecta. Los glóbulos rojos sensibilizados consisten en glóbulos rojos de oveja cubiertos con un antígeno toxoplasmático. Esta técnica permite detectar el anti-*Toxoplasma* IgG e IgM en el suero del paciente. Se pueden diferenciar tratando el suero con 2-mercaptoetanol (2-ME) que inhibe el poder aglutinante de IgM (2).
La presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en el suero conduce a la aglutinación de glóbulos rojos sensibilizados, lo que resulta en un velo marrón rojizo en el pocillo. En ausencia de anticuerpos específicos, estos glóbulos rojos se sedimentan en la parte inferior del pocillo en forma de anillo.
Los glóbulos rojos no sensibilizados garantizan la especificidad de la reacción y eliminan las interferencias causadas por las aglutininas naturales contra las ovejas (heteroanticuerpos de Forssman, anticuerpos contra la mononucleosis infecciosa, *etc*).
La reacción tiene lugar en una placa de microtitulación en forma de U.
El manejo es sencillo y rápido. Los resultados se obtienen en 2 horas.

4 – REACTIVOS Y MATERIALES

Descripción	Cantidad
R1: Recipiente con 2,4 mL de glóbulos rojos sensibilizados	**1**
R2: Recipiente con 1 mL de glóbulos rojos no sensibilizados	**1**
BUF: Recipiente con 55 mL de tampón de fosfato pH 7,2	**1**
R3 : Recipiente con 2 mL de adsorbente	**1**
CONTROL +: Recipiente con 0,2 mL de control positivo titulado	**1**
CONTROL -: Recipiente con 0,2 mL de control negativo	**1**
MICROPLATE: Microplacas en forma de U	**2**
DROPPER: Cuentagotas especial (18 ± 2 µL)	**2**

5 – PRECAUCIONES

- Los reactivos están destinados únicamente al diagnóstico *in vitro* y deben ser tratados por personal autorizado.
- Los reactivos y la microplaca pueden utilizarse hasta el número de pruebas indicado en la caja. Cada pocillo de la microplaca es de un solo uso.
- Todos los reactivos, excepto **BUF**, contienen sustancias de origen animal y deben tratarse con precaución.
- Las muestras son potencialmente infecciosas. Deben tratarse con las precauciones habituales y de conformidad con las normas de higiene vigentes en el país de uso.
- Los reactivos contienen azida sódica (concentración < 0.1%). La azida sódica contenida en los reactivos puede reaccionar con los metales pesados de las tuberías y formar compuestos explosivos. Por lo tanto, se recomienda no desecharlos por el desagüe y seguir las recomendaciones y normativas vigentes sobre eliminación de residuos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad.
- No utilice reactivos de diferentes lotes.
- No utilice reactivos dañados o mal conservados.
- Permita que los reactivos y las muestras vuelvan a la temperatura ambiente antes de realizar la prueba.
- Agitar cuidadosamente los reactivos **R1** y **R2** antes de su uso: la agitación manual o vorticial vigorosa es obligatoria para la homogeneización de los glóbulos rojos. Debe asegurarse de que no queden depósitos de glóbulos rojos en el fondo del vial.
- Al dosificar los reactivos **R1** y **R2**, asegúrese de que el gotero esté en posición vertical. Asegúrese de que no haya burbujas de aire en las gotas para que el caudal se mantenga constante.

6 – MUESTREO Y PROCESAMIENTO

Use sueros frescos obtenidos después de la recolección de sangre en un tubo seco (hasta 7 días de almacenamiento a +2°C y +8°C o -20°C para un almacenamiento superior a 7 días), y que no muestren ningún signo de hemólisis, turbidez, ictericia o contaminación. Se recomienda que cada laboratorio compruebe la compatibilidad de los tubos de muestreo utilizados.
Evitar la congelación y descongelación repetidas. No descomponga el suero.

7 – CONSERVACIÓN Y FABRICACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos están listos para su uso.
Los reactivos almacenados a +2°C y +8°C en su estado original son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja. No deben congelarse.

8 – MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipeta(s) automática(s) con volumen de pipeteo adaptado al volumen que se medirá.
- Recipientes para residuos contaminados
- 2-mercaptoetanol (2-ME)
- Centrífuga
- Tubos de hemólisis

9 – PROCEDIMIENTO

Permita que los reactivos y el suero que se van a analizar vuelvan a la temperatura ambiente antes de su uso.

9.1 – Preparación de la muestra

Diluir el suero a probar a 1/40:
- 50 µL de suero;
- 1,95 mL de reactivo **BUF**.

9.2 – Realización de la prueba de microplaca

- Con una micropipeta multicanal, añadir 50 µL de reactivo **BUF** a 8 pocillos de la microplaca.
- Con una micropipeta, añadir 50 µL del suero diluido en el 1er pocillo.
  Mezclar con el reactivo **BUF** y pipetear 50 µL del primer pocillo en el segundo, del segundo al tercero, y así sucesivamente hasta el sexto pocillo, eliminando 50 µL del sexto pocillo. Esto da como resultado diluciones de 1/80 a 1/2560.
- Añadir 50 µL de suero diluido en el séptimo pocillo.
  Mezclar con el reactivo **BUF** y desechar 50 µL.
  Esta dilución (1/80) representa el control del suero, cuya tarea es detectar las aglutininas naturales contra las ovejas que pueden contener ciertos sueros.
- Agite en vórtex o agite vigorosamente los reactivos **R1** y **R2** antes de su uso.
  - Añadir 1 gota de reactivo **R1** en los primeros 6 pocillos.
  - Añadir 1 gota de reactivo **R2** en el séptimo pocillo (control sérico).
  - Añadir 1 gota de reactivo **R1** en el octavo pocillo (control de reactivos) cuya función es controlar la validez del reactivo **BUF** y el reactivo **R1**.

Nota: Realice solo un control reactivo por cada serie de pruebas.
- Homogeneizar el contenido de los pocillos con mucho cuidado:
  - ya sea manualmente, golpeando lateralmente el lado de la microplaca, hasta completar la homogeneización de los pocillos;
  - o utilizando un agitador vibratorio para placas de microdilución (hasta 1500 rpm). No utilice un agitador orbital.
- A continuación, deje la placa quieta y libre de vibraciones, a temperatura ambiente entre +15°C y +30°C.
- Lea la reacción 2 h más tarde. Los resultados se pueden interpretar desde un mínimo de 1h30 de reacción y hasta un máximo de 24 horas.

9.3 – Detección de IgM: tratamiento con 2-mercaptoetanol

La determinación de anticuerpos anti-toxoplasmáticos, antes y después del tratamiento del suero con 2-ME, permite resaltar la presencia de anticuerpos IgM. Para probar el suero, proceda como se explica a continuación:
- Preparar la solución de 2-ME: 140 µL de 2-ME qsp 10 mL con reactivo **BUF**. Esta solución debe almacenarse en un frasco marrón. Es estable durante un mes entre +2°C y +8°C.
- Agitar y dosificar 50 µL de esta solución de 2-ME en 6 pocillos de la placa de microtitulación.
- Luego, desde el segundo paso, siga el protocolo "Realización de la prueba de microplaca".

9.4 - Adsorción de antiaglutininas ovinas naturales en caso de aglutinación del control sérico

- Agite el reactivo **R3** con cuidado.
- Póngalo en un tubo y mezcle:
  - 0,1 mL de suero;
  - 0,3 mL de reactivo **R3**.
- Incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- Centrifugar a 800 g durante 15 minutos.
- Recoger el sobrenadante; el suero se diluye a 1/4.
- Diluir el sobrenadante a 1/10 en el reactivo **BUF** para obtener una dilución de la sustancia adsorbida (1/40).
- Repita el protocolo " Realización de la prueba de microplaca" y reemplace la dilución stock con la dilución stock adsorbida.

10 – CONTROL DE CALIDAD INTERNO

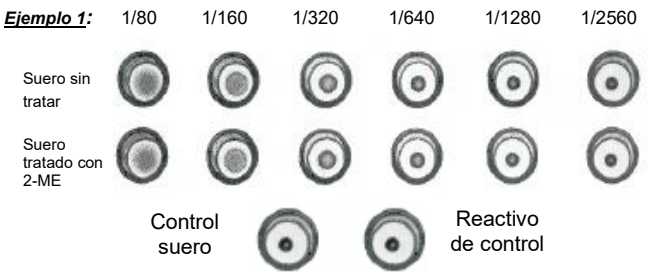
- Los reactivos **CONTROL+** y **CONTROL-** deben tratarse como sueros para su análisis. El título del **CONTROL+** debe coincidir con el título indicado en la etiqueta del frasco ± una dilución. El **CONTROL-** no debe tener hemaglutinación. Si no es así, la prueba no es válida.
- El control del suero debe desencadenar una reacción negativa (anillo). En el caso de hemaglutinación de este control, es necesario repetir la prueba después de que las aglutininas naturales contra las ovejas se hayan eliminado del suero por adsorción.
- El control reactivo debe desencadenar una reacción negativa (anillo). En caso de hemaglutinación de este control, no se puede utilizar **ELI.H.A TOXO**.

11 – LECTURA

Reacción negativa: **Ausencia de hemaglutinación**.
Presencia de un anillo más o menos ancho en la parte inferior del pocillo.

Reacción positiva: **Presencia de hemaglutinación.**
Presencia de un velo rojo/marrón que recubre el pocillo; a veces con un borde delgado.

Las imágenes reactivas de la hemaglutinación, obtenidas con suero positivo, se muestran a continuación:



Suero positivo al 1/160 sin IgM

Ejemplo 2: 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560

Suero positivo al 1/640 sin tratar – Suero tratado con 2-ME positivo al 1/80

Suero positivo que contiene IgM

El título se da por la primera dilución, que tiene un anillo ancho y periférico.
El título UI/mL corresponde al inverso de esta dilución límite multiplicado por el umbral de sensibilidad del reactivo indicado en el kit.
Ejemplo: Si un suero es positivo hasta una dilución de 1/320, y si el umbral de sensibilidad es de 0,1 UI/mL, el título de este suero es 320 x 0,1 = 32 UI/mL.

12 – INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Título < 1/80: Reacción negativa.
Sin anticuerpos anti-*Toxoplasma* o cantidad no detectable.

- Prueba de detección: probablemente paciente no inmune que solicita un seguimiento serológico para mujeres embarazadas y pacientes inmunocomprometidos.
- Prueba realizada en caso de posible infección aguda para un paciente inmunocompetente: sin infección por *Toxoplasma* o infección de inicio muy reciente. Debe controlarse en una segunda a muestra para detectar una posible aparición de anticuerpos.

Tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-ME):
El tratamiento del suero con 2-ME elimina la respuesta IgM. Una disminución del título de al menos 2 diluciones de suero antes y después del tratamiento con 2-ME indica la presencia de anticuerpos IgM. Presunción de toxoplasmosis progresiva.
De lo contrario: inmunidad anterior probable (anticuerpos residuales).

1/80 ≤ Título < 1/160: Reacción equívoca
Presencia de nivel límite de anticuerpos anti-*Toxoplasma*. Se puede demostrar una posible ausencia de IgM mediante el tratamiento sérico con 2-ME.

- Si la IgG es equívoca (1/80) e IgM negativa: realizar una técnica de confirmación de IgG de principio diferente; se recomienda enviar el suero a un laboratorio experto para llevar a cabo técnicas adicionales:
  → Si el resultado de las pruebas de IgG adicionales es negativo: concluir con la ausencia de anticuerpos IgG; seguimiento serológico a adaptar (embarazo o paciente inmunocomprometida).
  → Si el resultado de las pruebas de IgG adicionales es positivo: es probable una infección antigua; el resultado debe confirmarse en una nueva muestra tomada con 3 semanas de diferencia.

Título ≥ 1/160: Reacción positiva
Presencia de niveles significativos de anticuerpos anti-*Toxoplasma*. El tratamiento del suero con 2-ME se puede realizar para evaluar la presencia de IgM.

- Si IgG positiva (≥ 1/160) e IgM negativa:
  - En el caso de un paciente inmunocomprometido, presencia de una infección antigua; el resultado de la serología debe compararse con la clínica, la biología y el grado de inmunosupresión.
  - En el caso de una paciente inmunocompetente o embarazada, se debe realizar una prueba serológica 3 semanas después:
    → Si el título de IgG es estable: la infección es antigua.
    → Si el título de IgG está aumentando: realizar una datación de infección con un método de avidez de IgG para poder concluir sobre una infección reciente o una posible reactivación de la infección.
- Si IgG negativo e IgM positivo (≥ 1/160): en este caso, realice una técnica de confirmación de IgM basada en un principio diferente. Si los resultados son positivos y luego probable infección reciente, realice un nuevo control serológico a las 2 semanas. Si los resultados son negativos, no se puede descartar IgM no específica natural o interferencias, infección reciente, realizar un monitoreo serológico a las 2 semanas.
- Si IgG e IgM son positivas (≥ 1/160):
  - En el caso de un paciente inmunocomprometido, habrá que comparar los resultados serológicos con la clínica, la biología y el grado de inmunosupresión.
  - En el caso de una paciente inmunocompetente o embarazada, realizar la datación de la infección con una prueba de avidez de IgG.

13 – CAUSAS DE LOS ERRORES Y LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Almacenamiento incorrecto del suero.
- Almacenamiento incorrecto de los reactivos después de la apertura.
- Utilice únicamente el gotero incluido en el kit.
- No cambie los goteros de los reactivos **R1** y **R2**.
- En caso de una reacción positiva en los primeros 6 pozos, coloque las diluciones para la búsqueda del título de hemaglutinación marginal.
- Algunos sueros, cuya concentración de anticuerpos es muy alta, pueden provocar un fenómeno zonal (con retirada del velo) en las primeras diluciones que desaparecen en las siguientes diluciones.
- La nomenclatura francesa de biología médica prescribe que 2 pruebas deben realizarse simultáneamente para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis. Por lo tanto, la interpretación general de esta serología debe prepararse de acuerdo con los resultados de las diferentes técnicas. En todos los casos, es necesario integrar todos los datos clínicos, epidemiológicos y biológicos antes de realizar el diagnóstico final.

14 – RENDIMIENTO

14.1 – Sensibilidad / Especificidad / Diagnóstico

El umbral de sensibilidad del reactivo, expresado en UI/mL, se indica en la caja.
La sensibilidad de las técnicas propuestas para el serodiagnóstico de la toxoplasmosis a cada uno de estos anticuerpos varía según la naturaleza del antígeno utilizado en la reacción. Además, el estándar internacional puede contener un porcentaje relativo de cada uno de los anticuerpos diferente al del suero a analizar. Por lo tanto, el título expresado en UI/mL puede variar significativamente dependiendo de los métodos utilizados.
Es por eso que es esencial especificar la técnica utilizada en las unidades internacionales para rendir los resultados del diagnóstico.
La calidad de los reactivos permite que la reacción se realice por la noche y la lectura se realice a la mañana siguiente (después de un máximo de 24 horas de reacción), siempre que la microplaca no sufra ningún desplazamiento y esté protegida de las vibraciones. El reactivo **R1** consiste en glóbulos rojos sensibilizados por un antígeno de *Toxoplasma* total mixto que incluye constituyentes endógenos y de membrana del *Toxoplasma*. Garantiza la sensibilidad y la especificidad de la reacción.
Los resultados de sensibilidad y especificidad se sintetizaron en base a dos estudios (5,6). Un primer estudio que comprendía 1710 sueros positivos para IgG/IgM anti-*Toxoplasma* y 1290 sueros negativos (5), y un segundo estudio que comprendía 342 sueros positivos para IgG/IgM anti-*Toxoplasma* y 247 sueros negativos (6), se analizaron utilizando el modelo de metaanálisis (paquete "META") del software R (https://www.r-project.org/). Por lo tanto, los resultados de este metaanálisis muestran una sensibilidad diagnóstica del 99% IC 95% [99%-99%] y una especificidad diagnóstica del 98% IC 95% [96%-99%]. Los valores predictivos positivos (VPP) están entre el 98,3% y el 99,5% y los valores predictivos negativos (VPN) están entre el 98% y el 98,8%.

14.2 – Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de la prueba ELI.H.A TOXO se define por el umbral de sensibilidad y corresponde a la dilución del primer pocillo de la prueba. Su valor es igual a la inversa de esta dilución multiplicada por el umbral de sensibilidad.

14.3 – Repetibilidad

En sueros positivos con títulos superiores a 16 UI/mL, la prueba ELI.H.A TOXO tiene una repetibilidad del 100% con una tolerancia aceptable de +/- una dilución.
En sueros negativos estrictamente por debajo de 8 UI/mL, la prueba ELI.H.A TOXO tiene una repetibilidad del 100% sin tolerancia a la positividad en el resultado.

14.4 – Reproducibilidad

En sueros positivos con títulos superiores a 16 UI/mL, la prueba ELI.H.A TOXO tiene una reproducibilidad del 100% con una tolerancia aceptable de +/- una dilución. En sueros negativos estrictamente por debajo de 8 UI/mL, la prueba ELI.H.A TOXO tiene una reproducibilidad del 100% sin tolerancia a la positividad en el resultado.

14.5 – Interferencia

Se observaron reacciones cruzadas con muestras positivas de anticuerpos antinucleares o anticuerpos contra la sífilis. No se observaron reacciones cruzadas con anticuerpos de esclerodermia, IgM HA (hepatitis A), IgM CMV (citomegalovirus) o muestras positivas de anticuerpos de Lyme (6). Las posibles interferencias con la hemoglobina, los lípidos y la bilirrubina se estudiaron de acuerdo con las recomendaciones CLSI EP07 (7,8,9,10,11). No se detectó interferencia significativa hasta las siguientes concentraciones máximas:

Sustancia de ensayo	Concentraciones máximas.
Bilirrubina	800 mg/L
Lípidos	15 g/L
Hemoglobina	10 g/L

14.6 – Linealidad / Precisión

La prueba ELI.H.A TOXO permite obtener resultados de titulación directamente proporcionales a la cantidad de analito (anticuerpo anti-*Toxoplasma gondii*) presente en la muestra, en el rango de medición de 8 a 256 UI/mL.
El sesgo de precisión del método ELI.H.A TOXO es:

Suero < 8 UI/mL:	0%
Suero a 10,4 UI/mL:	15,38%
Suero a 213,5 UI/mL:	-10,07%

15 – GESTIÓN DE RESIDUOS

Los residuos deben eliminarse de acuerdo con las normas y regulaciones de higiene aplicables en el país para este tipo de productos. Si el reactivo **BUF** se derrama accidentalmente, limpie la superficie de trabajo con papel absorbente y enjuague con agua. Si se derrama suero u otros reactivos, limpie con lejía y toallas de papel.

16 – BIBLIOGRAFÍA

1. Société Française de Microbiologie Toxoplasmose. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2022 : p.1011 - 1022
2. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Technique d'agglutination. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p169 -172
3. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Toxoplasmose. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p279 – 288
4. Rapport HAS – Février 2017 – Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire EVALUATION DES TECHNOLOGIES DE SANTÉ - Mis en ligne le 13 févr. 2017 https://www.has-sante.fr/jcms/c_2653655/fr/diagnostic-biologique-de-la-toxoplasmose-acquise-du-sujet-immunocompetent-dont-la-femme-enceinte-la-toxoplasmose-congenitale-diagnostic-pre-et-postnatal-et-la-toxoplasmose-oculaire
5. J.-C. Fourlinnie R. Guffroy, J.-C. Herbaut, et al. Optmisation du dépistage des anticorps antitoxoplasmiques IgG et IgM par l'association d'une réaction d'hemagglutination indirecte et d'un test au latex standardisé sur plaque de kine, Feuillets de biologie, 1985-Vol.XXVI-N146
6. Villard O, Cimon B, Franck J, et al. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(3):231-235.
7. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Filling in the gaps with non-standard body fluids. Pract Lab Med. 2016 Mar 16;5:24-31. doi: 10.1016/j.plabm.2016.03.003. PMID: 28856201; PMCID: PMC5574517.
8. CLSI.Interference Testing in Clinical Chemistry.3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p23-24
9. CLSI.Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry.1st ed. CLSI supplement EP37. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p94-96
10. Hyperbilirubinémie néonatale - Pédiatrie - Édition professionnelle du Manuel MSD § Etiologie de l'hyperbilirubinémie néonatale p5 (msdmanuals.com)
11. Bilirubine - Normes biologiques - Cours IFSI - Fiche IDE §Présence d'ictère p3 (fiches-ide.fr)

Cualquier incidente grave relacionado con el dispositivo deberá notificarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario.

El Resumen de Seguridad y Rendimiento (SSP) estará disponible a través de la base de datos europea EUDAMED tan pronto como esté completamente operativa: https://ec.europa.eu/tools/eudamed

Los cambios respecto a la versión anterior están resaltados en gris.

ELITech MICROBIO
Parc d 'activités du Plateau
Allée d 'Athènes 83870 SIGNES
FRANCE
☎: +33 (0)4 94 88 55 00
http://www.elitechgroup.com