

ELI.H.A Toxo

Serodiagnóstico de la toxoplasmosis por hemaglutinación indirecta

120 pruebas

(Ref. 66610)

8000160-ES-2012-02



Para el diagnóstico *in vitro*, para uso profesional.
Las pruebas son para un solo uso.

1- FINALIDAD

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

2 - INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una infección parasitaria cuyo agente causal es el protozoo *Toxoplasma gondii*. Benigno o, en la gran mayoría de los casos, incluso asintomático, esto solo representa un riesgo grave para las mujeres embarazadas seronegativas 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.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A Toxo se basa en el principio de la hemaglutinación indirecta. Los glóbulos rojos sensibilizados consisten en glóbulos rojos de ovejas cubiertas con un antígeno toxoplasmático. Esta técnica se utiliza para la detección de IgG y IgM antitoxoplasmáticos. Se pueden distinguir por el tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol (2-ME), que inhibe la fuerza de unión de IgM.

La presencia de anticuerpos anti-toxoplasmagondii en el suero conduce a la aglutinación de glóbulos rojos sensibilizados, lo que resulta en un velo marrón rojizo en el pozo. En ausencia de anticuerpos específicos, estos glóbulos rojos se sedimentan en la parte inferior del pozo 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	Número
R1 : Recipiente con 2,4 mL de glóbulos rojos sensibilizados	1
R2 : Recipiente que contiene 1 mL de glóbulos rojos no sensibilizados	1
BUF : Depósito con 55 mL de tampón de fosfato pH 7,2	1
R3 : recipiente con 2 mL de adsorbente	1
CONTROL + : recipiente con control positivo titulado de 0,2 mL	1
CONTROL - : recipiente con control negativo de 0,2 mL	1
MICROPLACA : microplacas en forma de U	2
DROPPER : cuentagotas especial (18 ± 2 µL)	2

5 - PRECAUCIONES DE USO

- Los reactivos están destinados únicamente al diagnóstico *in vitro* y deben ser tratados por personal autorizado.
- Las pruebas son para 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 recipientes **CONTROL** contienen azida sódica (<0,1%).
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad.
- No utilice reactivos de diferentes lotes.
- Espere a que el suero y los reactivos se equilibren a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.
- Agitar cuidadosamente los reactivos **R1** y **R2** antes de su uso.
- 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 o sueros almacenados a -20°C que estén libres de hemólisis, turbidez o contaminación. Evitar la congelación y descongelación repetidas. No descomponga el suero.

7 - CONSERVACIÓN Y FABRICACIÓN DE REACTIVOS

Los reactivos están listos para su uso. Una vez abierto, todos los reactivos almacenados a 2-8°C son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. No deben congelarse.

8 - MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipeta(s) automática (s) con volumen de pipeteo adaptado a la cantidad a medir
- Recipientes para residuos contaminados
- 2-mercaptoetanol (2-ME)
- Centrífuga
- Tubos de hemólisis.

9 - PROCEDIMIENTO

Deje que los reactivos se equilibren a 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 microplacas

- Añadir 50 µL de reactivo **BUF** a 8 pozos de la placa de microtitulación con una pipeta multicanal.
- Con una micropipeta, vierta 50 µL del suero diluido en el 1er pozo. Mezclar con el reactivo **BUF** y pipetear 50 µL del primer pozo en el segundo, del segundo al tercero, y así sucesivamente hasta el sexto pozo, eliminando 50 µL del sexto pozo. Esto da como resultado diluciones de 1/80 a 1/2560.
- Añadir 50 µL de suero diluido en el séptimo pozo. 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.
- Agitar con cuidado los reactivos **R1** y **R2**.
 - Coloque 1 gota de reactivo **R1** en los primeros 6 pozos.
 - Coloque 1 gota de reactivo **R2** en el séptimo pozo (control sérico).
 - Coloque 1 gota de reactivo **R1** en el octavo pozo (control de reactivos), cuya tarea es controlar la validez del reactivo **BUF** y el reactivo **R1**.

Nota: Realice solo un control reactivo por ejecución de prueba.
- Homogeneizar el contenido de los pozos con mucho cuidado:

- ya sea manualmente golpeando los lados de la microplaca sobre los lados;
 - o por medio de agitador para placas de microtitulación. No utilice un agitador orbital.
- A continuación, deje la placa quieta y libre de vibraciones.
- Lea la reacción 2 h más tarde.

9.3 - Detección de IgM: tratamiento con 2-mercaptoetanol

La determinación de anticuerpos antitoxoplasmáticos antes y después del tratamiento del suero con 2-ME permite resaltar la presencia de anticuerpos IgM.

- 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. Está estable a +2°...+8°C durante 1 mes.
- Agitar y dosificar 50 µL de esta solución de 2-ME en 6 pozos 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 durante la glutinación 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 "Realizar la prueba en microplaca" y reemplace la dilución de la madre con la dilución de la madre adsorbida.

10 - CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Los reactivos **CONTROL+** y **CONTROL-** deben tratarse como sueros para su análisis. El título de **CONTROL+** debe coincidir con el título indicado en la etiqueta del frasco a ± 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). Si este control es hemaglutinado, 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 pozo.

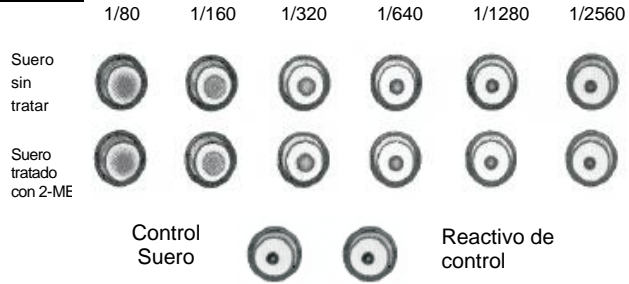
Reacción positiva:

Presencia de hemaglutinación.

Presencia de un velo rojo/marrón que recubre el pozo; a veces con un borde delgado.

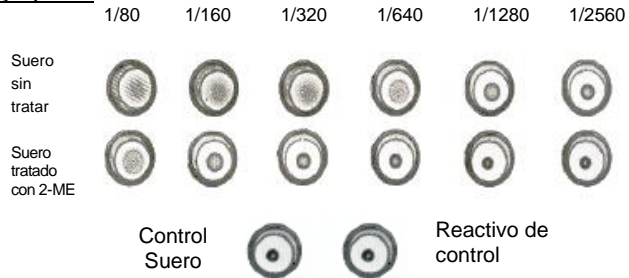
Las imágenes reactivas de la hemaglutinación obtenidas con sueros positivos se muestran a continuación.

Ejemplo 1:



↙ Serum positivo al 1/160 sin IgM

Ejemplo B 2:



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 el umbral de sensibilidad es de 0,1 UI / ml, el título de este suero es $320 \times 0,1 = 32$ UI / ml.

12 – INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Título < 1/80 : Reacción negativa.

Ausencia de anticuerpos anti-toxoplasma o nivel indetectable.

- **Examen de detección:** ausencia de inmunidad probable que requiere monitoreo serológico en caso de embarazo.

- **Investigación en caso de sospecha de infección toxoplasmática:**

Ausencia de infección toxoplasmática o infección muy temprana.

Comprobar con una nueva muestra para resaltar la posible aparición de anticuerpos.

1/80 ≤ título < 1/160: Reacción positiva.

Presencia de anticuerpos anti-toxoplasma de límite.

- **Examen de cribado:** interpretar de acuerdo con los resultados de todas las técnicas de serología toxoplasmática aplicadas al suero. Si procede, se someterá a ensayo una nueva muestra.

- **Examen de seguimiento de una mujer embarazada que se sabe que no es inmune, o examen en caso de sospecha de una nueva infección:** probablemente toxoplasmosis activa. Se debe realizar una prueba de IgM.

Se recomienda hacer un control con una nueva muestra 15 a 21 días después.

Título ≥ 1/160: Reacción positiva.

Anticuerpos anti-toxoplasma.

- **Prueba de detección:** inmunidad pasada probable (anticuerpos residuales).
- **Examen de seguimiento de una mujer embarazada que se sabe que no es inmune, o examen en caso de sospecha de una nueva infección:** probablemente toxoplasmosis activa.

Se recomienda tratar el suero con 2-ME para buscar la presencia de IgM y realizar un control con una nueva muestra.

Tratamiento con 2-ME:

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).

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 lo siguiente 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

El umbral de sensibilidad del reactivo, expresado en UI/mL, se muestra en el kit. La sensibilidad de las técnicas propuestas para el ensayo de toxoplasmosis a cada uno de estos anticuerpos depende del tipo de antígeno utilizado en la reacción.

Además, el estándar internacional puede contener un porcentaje relativo de cada anticuerpo, que es diferente del del suero que se está probando.

Por lo tanto, el título expresado en IU/mL puede variar ampliamente según el método utilizado.

Por lo tanto, es importante especificar la técnica utilizada para representar los resultados del diagnóstico en unidades internacionales.

La calidad de los reactivos permite la reacción por la noche y la medición a la mañana siguiente, a menos que la placa de microtitulación se mueva y se proteja de las vibraciones.

El reactivo R1 consiste en glóbulos rojos sensibilizados con un antígeno total mixto de toxoplasma que contiene componentes endógenos y de membrana del toxoplasma. Asegura la sensibilidad y especificidad de la reacción.

Por ejemplo, los resultados de las evaluaciones de las pruebas muestran una sensibilidad del 99,2% y una especificidad del 97,7%.

Cuando este reactivo se asocia con **ELITex Toxo**, se logra una correlación del 98,2 (18) al 99,8% (17) dependiendo de la técnica de referencia utilizada.

En la " Réévaluation de 40 troussees de réactifs pour la détection des anticorps anti-toxoplasmosis de type IgG " realizada por la Agencia de Drogas en marzo de 1998 (19), se analizaron 40 sueros diferentes con **ELI.H.A Toxo**:

- 9 sueros negativos dieron resultados negativos
- No se observó ninguna reacción adversa en 7 sueros límite positivo probado
- 24 sueros positivos han sido identificados como tales

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. P. WATTRE, R. BRULE, A. CAPRON, J. SAMAILLE et J. FRUIT - Análisis antigénico de *Toxoplasma gondii* et diagnon immunologique de la toxoplasmosis humaine - *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, 1969, XX, 167-182.
2. P. AMBROISE-THOMAS - La toxoplasmosis - *Cahiers Médicaux Lyonnais*, 1972, 48.
3. P. AMBROISE-THOMAS - La détection des anticorps IgG et IgM dans le diagnostic de la toxoplasmosis acquise et la prévention de la toxoplasmosis congénitale - *Bull. SOC. Pathol. hum. et comp.*, 1972, 4, 211.
4. G. ETCHARRY, F. ETCHARRY-LAPEYRE, J. TRIBOULEY, A. CAPBERN et R. PAUTRIZEL - Intérêt d'une réaction d'hémagglutination passive pour le diagnostic de la toxoplasmosis - *Ann. Biol. Clin.*, 1973, 31,439-446.
5. CAPRON, P. WATTRE, A. VERNES et G. DELAUNOY - Le diagnostic immunologique de la toxoplasmosis - *Lille Médical*, 1974, 19, 2, 147-150.
6. CAPRON, A. VERNES, P. WATTRE, M. DELECOUR, J.-C. MONNIER, J.-L. LEROY, M.-F. DEVARENNE, S. MONARD, G. TAJCHNER, G. DURIEUX et MENDOLIA - La toxoplasmosis en milieu fruitier - *Lille Médical*, 1974, 19, 6, 646-650.
7. J.-M. SENET et R. ROBERT - Hémagglutination indirecte utilisant un antigène particulaire. application au diagnostic immunologique de la toxoplasmosis - *Med. et Mal. Inf.*, 1974, 4, 1, 21-22.
8. P. AMBROISE-THOMAS - L'immuno-fluorescence aux anti-IgM marquées dans le diagnon précoce de la toxoplasmosis acquise ou congénitale. Bilan de 24.000 examenes. - *Fondation Mérieux Edit.*, Lyon, 1975.
9. G. DESMONTS - Séro-diagnostic de la toxoplasmosis. Intérêt et limites des différentes méthodes. Leur application au diagnostic de la toxoplasmosis acquise - *Feuillets de Biologie*, 1975, 16, 61, final.
10. P. WATTRE, J.-C. DUGIMONT, M. CAPRON et A. CAPRON - Evaluation des méthodes d'hémagglutination indirecte dans les toxoplasmoses humaines et expérimentales - *Fondation Mérieux Edit.*, Lyon, 1975, 49-59.
11. M.-E. CAMARGO, P.-G. LESER et W.-S.-P. LEGER - Diagnostic information from serological testin human toxoplasmosis. I. Un estudio comparativo de hemaglutinación, fijación de complejo, IgG y pruebas de inmunofluorescencia IgM en 3.752 muestras de suero - *Rev. Med. Trop.* Sao Paulo, 1976, 18.
12. M.-E. CAMARGO et P.-G. LECTORES - Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II. Estudio evolutivo de los anticuerpos y los patrones serológicos en la toxoplasmosis adquirida detectados por la hemaglutinación, la fijación del complejo, la LgG y las pruebas de inmunofluorescencia de la LgM - *Rev. Med. Trop.* Sao Paulo, 1976, 18, 227.
13. J.-M. SENET, R. ROBERT et G. MAURAS - Diagnostic de la toxoplasmosis par hémagglutination indirecte. I. Etude comparative de la fixation par le glutaraldéhyde sur desglobules rouges formolés d'un antigène endogène soluble, d'un antigène particulaire insoluble et d'un antigène total - *Biomédecine*, 1976, 25, 191.
14. J.-M. SENET, R. ROBERT et G. MAURAS - Diagnostic de la toxoplasmosis par hémagglutination indirecte. II. Intérêt de la fixation de l'antigène total mixte en présence de glutaraldéhyde dans le diagnostic précoce de l'affection - *Biomédecine*, 1976, 25, 212.
15. P. AMBROISE-THOMAS, J. SIMON et M. RAYARD - L'hémagglutination indirecte avec antigène total mixte, dans le contrôle de l'immunité antitoxoplasmique et le séro-diagnostic de la toxoplasmosis humaine. Comparaison à l'immuno-fluorescence - *Biomédecine*, 1978, 29, 245-248
16. J.-M. SENET et R. ROBERT - Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmosis et à l'aspergillose - *Arch. Med. de l'Ouest*, 1979, 11,1, 39-42.
17. J.-C. FOURLINNIE, R. GUFFROY, J.-C. HERBAUT et A. LABARTHE - Optimisation du dépistage des anticorps antitoxoplasmiques IgG et IgM par l'association d'une réaction d'hémagglutination indirecte et d'un test au latex standardisé sur plaque de Kline - *Feuillets de Biologie*, 1985, Vol. XXVI, N°146, 47-49.
18. P. LE PAPE, U. MUÑOZ, M.-L. TROMEUR et M. MARJOLET - Association d'un test au latex et d'une réaction d'hémagglutination indirecte pour le dépistage de la toxoplasmosis: étude sérologique et enquête dans le secteur privé - *Feuillets de Biologie*, 1996, Vol. XXXVII, N°210.
19. J.-C. PETITHORY, M. MILGRAM, C. JANOT, P. MAISONNEUVE, M.-L. MIGUERES, N. CHARLIER, M. FROMAGE, F. BERTHELOT et A. LEBLANC - Réévaluation de 40 troussees de réactifs pour la détection des anticorps anti-toxoplasmosis de type IgG - *Revue française des laboratoires*, mars 1998, N° 301.

Los cambios desde la última revisión son de color gris.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
Fax: 33 (0)4 94 32 82 61
<http://www.elitechgroup.com>

