



Toxotest IgM

ELISA

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*

SIGNIFICACION CLINICA

La toxoplasmosis es una enfermedad infecciosa del hombre y de los animales, de distribución universal, cuyo agente etiológico es un parásito intracelular obligado, el *Toxoplasma gondii*.

Es una enfermedad generalmente benigna y asintomática en individuos inmunocompetentes, convirtiéndose en una seria complicación en pacientes inmunocomprometidos.

Cuando la infección se adquiere durante la gestación, existe un alto riesgo de infección del feto, pudiendo provocar abortos o lesiones graves en el mismo. Las lesiones provocadas en el feto son más severas cuanto más temprana en el embarazo sea la infección materna.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La muestra previamente diluida se coloca en la policubeta, cuyos pocillos se encuentran sensibilizados con anticuerpos anti-IgM humanos. Las IgM de la muestra formarán complejos con los anticuerpos y permanecerán unidos a la fase sólida. La fracción no unida se elimina por lavado y luego se agrega el conjugado constituido por antígenos del parásito y anticuerpo monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* conjugado con peroxidasa. Este complejo reacciona específicamente con las IgM anti-*T. gondii* inmunocapturados. El complejo no unido se elimina por lavado. La presencia de peroxidasa unida se revela mediante el agregado del sustrato cromogénico, tetrametilbencidina. Las muestras reactivas desarrollan color celeste. La reacción enzimática se detiene mediante el agregado de ácido sulfúrico, produciendo un viraje del color celeste al amarillo. La intensidad del color medido en espectrofotómetro a 450 y 405 nm será directamente proporcional a la concentración de IgM anti-*Toxoplasma gondii* en controles y muestras.

REACTIVOS PROVISTOS

Policubeta sensibilizada: pocillos recubiertos con anticuerpos anti-IgM humana monoclonal.

Diluyente de Muestra: buffer salino con tensioactivo. Color violeta.

Conjugado: antígenos inactivados de *Toxoplasma gondii* más anticuerpo monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* conjugado con peroxidasa, liofilizado.

Diluyente de Conjugado: buffer salino con proteínas. Color rojo.

Revelador: solución de tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno.

Stopper: ácido sulfúrico 2 N.

Buffer de Lavado Concentrado: buffer salino con tensio-

activo (25x). Color verde.

Control Positivo: IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

Control Cut-off: IgM anti-*Toxoplasma gondii* en baja concentración.

Control Negativo: dilución de suero humano inactivado no reactivo para IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada o desionizada

MATERIAL REQUERIDO (no provistos)

- Micropipetas para medir los volúmenes indicados
- Estufa a 37°C
- Reloj alarma o cronómetro
- Sistema de lavado de policubetas (manual o automático)
- Espectrofotómetro para lectura de policubetas

PRECAUCIONES

Para obtener resultados correctos y reproducibles:

- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- Evitar tocar las paredes de los pocillos con los tips.
- Las policubetas deben incubarse en estufa. No usar baño de agua.
- Asegurarse que los reactivos estén perfectamente a temperatura ambiente antes de realizar la prueba.
- Usar agua destilada o desionizada perfectamente limpia.
- Utilizar material limpio, libre de metales o agentes oxidantes.
- Evitar la contaminación del conjugado con aerosoles, saliva, etc.
- No modificar la técnica de ensayo en tiempos y temperatura del ensayo.

Para impedir la contaminación personal y del medio ambiente:

- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Los controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y hepatitis C (HCV), encontrándose no reactivos. Sin embargo, se recomienda manipularlos con las precauciones requeridas para muestras potencialmente infecciosas.
- Evitar contacto del ácido sulfúrico (Stopper) con piel y mucosas. Si esto ocurre enjuagar con abundante agua. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares

graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

- Evitar el derrame de líquidos y formación de aerosoles.
- Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No pipetear con la boca. Usar guantes descartables y protección en los ojos durante la manipulación de las muestras y reactivos del ensayo.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa vigente.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- **Buffer de Lavado:** a baja temperatura los componentes del reactivo concentrado pueden precipitar. En tal caso, llevar la solución a 37°C hasta disolución completa. Para la obtención del buffer de lavado listo para usar, diluir una parte de Buffer de Lavado Concentrado (25x) con 24 partes de agua destilada o desionizada. Ej.: 20 ml con 480 ml para una policubeta.
- **Conjugado:** reconstituir el Conjugado liofilizado con el volumen de Diluyente de Conjugado indicado en el rótulo.
- **Policubeta sensibilizada, Diluyente de Muestra, Diluyente de Conjugado, Revelador, Stopper, Controles:** listos para usar.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los Reactivos Provisos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Buffer de Lavado Concentrado y Stopper: se pueden conservar a temperatura entre 2 y 25°C.

Buffer de Lavado (1x): una vez diluido es estable 3 meses a temperatura entre 2 y 25°C.

Conjugado: una vez diluido es estable 15 días en heladera (2-10°C) o 30 días a -20°C. En este caso no descongelar más de 1 vez.

Policubeta sensibilizada: no abrir el sobre hasta el momento de usar, ni antes que haya tomado temperatura ambiente. Las tiras no utilizadas deben conservarse a 2-10°C dentro del sobre con desecante bien cerrado. Las tiras conservadas en estas condiciones pueden ser utilizadas dentro de los 4 meses posteriores mientras no supere la fecha de vencimiento indicada en la caja.

MUESTRA

Suero o plasma

- a) **Recolección de muestra:** obtener de la manera habitual.
- b) **Aditivos:** no se requieren para suero. Para las muestras de plasma se puede emplear heparina, citrato o EDTA como anticoagulante.

c) Sustancias Interferentes conocidas: no se ha observado interferencia con muestras que contienen hasta 30 mg/dl de bilirrubina, 50 mg/dl de ácido ascórbico, 1500 mg/dl de triglicéridos o 300 mg/dl de hemoglobina. Muestras conteniendo partículas deberán clarificarse mediante centrifugación.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra se debe conservar refrigerada (2-10°C). En caso de no realizar el análisis dentro de las 72 horas se debe congelar a -20°C. No es recomendable realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento. En caso de utilizar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas antes de su uso.

La inactivación por calor puede afectar el resultado.

No utilizar muestras con contaminación microbiana.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1- Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba.

2- Preparar el volumen necesario de buffer de lavado (1x).

3- Colocar en el soporte de tiras, el número de pocillos requeridos para la cantidad de determinaciones a realizar, incluyendo 1 pocillo para el Control Positivo (CP), 1 pocillo para el Control Cut-off (Cco) y 1 pocillo para el Control Negativo (CN).

4- Diluir la muestra 1:101 con el Diluyente de Muestra, colocando 10 µl de muestra y 1000 µl de diluyente (en tubo). Los Controles no deben ser diluidos.

5- Pipetear 100 µl de Controles y de las muestras diluidas.

6- Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la cinta autoadhesiva provista, e incubar 60 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C. En forma paralela, preparar el conjugado.

7- Después de la incubación eliminar el líquido de cada pocillo por completo. Lavar 5 veces según instrucción de lavado (ver Procedimiento de Lavado).

8- Agregar 100 µl de Conjugado. Para evitar la evaporación cubrir la policubeta con cinta autoadhesiva.

9- Incubar 60 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C.

10- Lavar 5 veces según instrucción de lavado.

11- Dispensar 100 µl del Revelador.

12- Incubar 30 ± 2 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), protegido de la luz.

13- Agregar 100 µl del Stopper.

14- Leer absorbancia en espectrofotómetro en forma bicromática a 450/620-650 nm o a 450 nm.

En caso de absorbancias elevadas (por encima del valor máximo de lectura del espectrofotómetro usado) leer a 405/620-650 nm. Esto permite un mayor rango de la curva.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 10 minutos, por lo que los resultados deben leerse dentro de ese lapso.

PROCEDIMIENTO DE LAVADO

Eliminar el líquido de los pocillos por aspirado o volcado.

Los pocillos se lavan con 350 µl de Buffer de Lavado diluido.

Evitar desbordes de líquido. La solución de lavado debe estar en contacto con los pocillos entre 30 y 60 segundos. Garantizar que luego del último lavado no quede líquido residual. Realice un doble aspirado para eliminar el excedente de buffer. También se puede invertir la placa sobre papel absorbente y golpearla varias veces, de lo contrario podrán obtenerse resultados erróneos.

Nota: el procedimiento de lavado es crítico para el resultado del ensayo. Si queda buffer de lavado en el pocillo o si los pocillos no están completamente llenos se obtendrán resultados erróneos. No dejar que los pocillos se sequen durante el procedimiento.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ETAPA	PROCEDIMIENTO
Dilución de la Muestra	10 µl de muestra en 1000 µl de Diluyente de Muestra
Muestras	Agregar 100 µl de Muestra diluida, CN, CP y Cco
Incubación	Incubar durante 60 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C
Lavado	Lavar cada pocillo con 350 µl de Buffer de Lavado (5 veces)
Reconstitución del conjugado	Reconstituir el Conjugado concentrado
Conjugado	Agregar 100 µl de Conjugado diluido
Incubación	Incubar durante 60 ± 2 minutos a 37°C ± 1°C
Lavado	Idem al lavado anterior
Revelado	Agregar 100 µl de Revelador
Incubación	Durante 30 ± 2 minutos entre 18-25°C
Detención	Agregar 100 µl de Stopper
Lectura	Leer en espectrofotómetro

CALCULO DE RESULTADOS

Se debe considerar la densidad óptica del Control Negativo y del Control Cut-off. La presencia o ausencia de anticuerpos IgM de *Toxoplasma gondii* se define por comparación con la absorbancia del Control Cut-off. Las muestras con una densidad óptica menor que la del Control Cut-off son consideradas no reactivas para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*. Las muestras con una densidad óptica mayor que la del Control cut-off son consideradas reactivas para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

Las muestras con absorbancias dentro de un rango de ±10% Control Cut-off deben ser consideradas dudosas y ensayadas nuevamente para su confirmación.

Ejemplo de cálculo

Los valores siguientes deben tomarse solo como ejemplo y no deben ser usados en lugar de datos experimentales:

Descripción	Absorbancia (450- 620 nm)
Control Negativo	0,160
Control Cut-off	0,603
Control Positivo	1,568
Muestra	0,750

La muestra ensayada resulta positiva para IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

CRITERIOS DE VALIDACION DEL ENSAYO

El ensayo se considera válido si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones (con lectura a 450-620 nm):

- 1- La absorbancia del Control Negativo deben ser $\leq 0,300$.
- 2- La absorbancia del Control Positivo debe ser $> 0,900$.
- 3- La relación entre la absorbancia del Control Positivo y la absorbancia del Control Cut-off debe ser $> 1,5$.
- 4- La relación entre la absorbancia del Control Negativo y la absorbancia del control Cut-off debe ser $< 0,5$.

Si una de estas condiciones no se cumple, repetir el ensayo. Recordar que las lecturas obtenidas dependerán de la sensibilidad del aparato empleado.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Muestras No Reactivas: son consideradas negativas para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

Muestras Reactivas: son consideradas positivas para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii*.

Muestras dudosas: deben ser repetidas para su confirmación

Toda muestra inicialmente reactiva debe ser repetida por duplicado. Si una o ambas repeticiones dan positivas, la misma debe considerarse reactiva.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias Interferentes conocidas en Muestra.

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS DE PERFORMANCE

Sensibilidad clínica

En un estudio realizado sobre 108 muestras con infección aguda de toxoplasmosis se encontraron reactivas un 99,1% con el kit Toxotest IgM ELISA.

Especificidad

En un estudio realizado sobre 276 muestras de sueros y plasmas negativos para IgM para *T. gondii* de 3 centros de salud diferentes, se encontró una especificidad de 99,61%. En otro estudio realizado sobre 236 muestras de sueros y plasmas negativos para IgM para *T.gondii* de 2 centros de salud diferentes, se encontró una especificidad de 97,91%. Se estudió la posible aparición de reactividades cruzadas ensayando muestras provenientes de 100 individuos negativos para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* pero con diferentes condiciones clínicas que pueden ser causantes de reacciones inespecíficas para el ensayo Toxotest IgM ELISA.

Estas condiciones incluyen pacientes con enfermedades autoinmunes (factor reumatoideo, anticuerpos anti-núcleo, etc) o enfermedades infecciosas diferentes a Toxoplasmosis (Chagas, HIV, HTLV, hepatitis C, hepatitis B, sífilis, otras). En esta población se incluyeron 24 muestras positivas para factor reumatoideo. Para esta población la especificidad fue de 99% donde el único falso positivo fue para Factor reumatoideo.

Precisión

Se evaluó la precisión del test siguiendo el protocolo EP15A recomendado por la CLSI. Los ensayos fueron realizados con muestras de diferentes niveles de reactividad y con los controles. Se realizó 1 ensayo diario evaluando cada muestra por cuadruplicado por el transcurso de 5 días.

	Media IP(DO/CO)	Intra-ensayo		Total	
		S	CV	S	CV
Muestra 1	2,73	0,128	4,70%	0,180	6,59%
Muestra 2	2,27	0,147	6,49%	0,197	8,68%
Muestra 3	1,40	0,079	5,61%	0,115	8,18%
Muestra 4	0,43	0,024	5,71%	0,050	11,74%

n = 20

PRESENTACION

Kit para 96 determinaciones (Cód. 1743251).

BIBLIOGRAFIA

- Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, EP17-A (2004).
- User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy – Approved Guideline EP15-A (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Policubeta **Sensib.**

Policubeta sensibilizada

Diluyente **Muestra**

Diluyente de Muestra

Conjugado

Conjugado

Conjugado **Diluy.**

Diluyente de Conjugado

Revelador

Revelador

Buf. Lavado **Conc.**

Buffer de Lavado Concentrado

Control **+**

Control Positivo

Control **-**

Control Negativo

Stopper

Stopper

Control **cut-off**

Control Cut-off

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

EC **REP**

Representante autorizado en la Comunidad Europea

IVD

Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución

Cont.

Contenido

LOT

Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar instrucciones de uso

Calibr.

Calibrador

CONTROL

Control

CONTROL **+**

Control Positivo

CONTROL **-**

Control Negativo

REF

Número de catálogo

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-99



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina