

AD TOXO COLOR

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN DIRECTA COLOREADA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL TOXOPLASMA GONDII

Uso "In Vitro"

480 determinaciones de un título o 96 determinaciones de cinco títulos

APLICACION

AD TOXO COLOR puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de casos presuntivos de Toxoplasmosis o para ensayos epidemiológicos, a través de la detección de anticuerpos IgM o IgG específicos contra antígenos de la membrana del Toxoplasma gondii.

FUNDAMENTO DEL METODO

En toda infección primaria, los anticuerpos que produce el organismo son macroglobulinas 19 S (IgM) y algunas globulinas 7 S (IgG). La presencia de IgM antitoxoplasma permite, en general, suponer una toxoplasmosis reciente. El título de estos anticuerpos disminuye en los meses siguientes mientras comienza a aumentar las IgG e IgA antitoxoplasma. Las moléculas IgG e IgM se comportan de modo diferente frente a la acción de agentes reductores como el 2-Mercaptoetanol (2-ME). El 2-ME fracciona las IgM en subunidades 5 S sin capacidad aglutinante, en tanto que no actúa sobre las IgG. Este hecho permite utilizar la AD para diferenciar serológicamente una infección reciente (**aguda**) de una infección antigua (**crónica**). Por tanto, el método consiste en realizar titulaciones del suero tratado con 2-ME o sin tratar. En la lectura se observará aglutinación o sedimentación del Toxoplasma gondii.

REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS

Frasco N° 1: **Antígeno coloreado.** 12 ml de suspensión estabilizada de Toxoplasma gondii coloreados. Agitar intensamente antes de usar. Contiene Formol 0,18% P/V como conservador.

Frasco N° 2: **Diluyente de Muestras.** 30 ml de solución salina con conservadores. Contiene Formol 0,18% P/V como conservador.

Ampolla N° 3: 1 ml de 2-ME.

Frasco N° 4: **Solución Proteica.** 0,3 ml de solución proteica estabilizada, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador.

Frasco N° 5: **Control Positivo.** 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra T.gondii, titulado, inactivado, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Frasco N° 6: **Control Negativo.** 0,5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra T. gondii, inactivado, con Azida de Sodio 0,2% P/V como conservador. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

Frasco vacío para acondicionar el 2-ME una vez abierta la ampolla.

5 Policubetas descartables, cada una con 96 pocillos con fondo en "U".

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- * Microgoteros de 25 µl
- * Microdiluidores o micropipetas de 25 µl
- * Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- * Papel de filtro

- * Agua destilada o agua desionizada
- * Solución fisiológica
- * Baño de agua termostatzado a 37 °C o estufa a 37 °C
- * Recipientes adecuados para el tratamiento con 2-ME.
- * Fondo oscuro y lámpara para lectura de las policubetas

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos. Guardar los componentes del kit entre 2 y 8 °C, siempre en posición vertical. **No congelar.**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico “In Vitro”.
- Las muestras de sueros humanos y los controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
- Todo material utilizado en la reacción debe ser considerado contaminado, debiendo ser inactivado con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos, ó autoclavado durante por lo menos 1 hora a 121,5°C.
- Defectos en el volumen de dispensado del Control Positivo ocasionados por su viscosidad, puede dar títulos diferentes al declarado. Por eso es necesario extremar las precauciones en su manipulación.
- No utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Verificar que el volumen de las micropipetas o microdiluidores sea el correcto.
- **No congelar el kit**, pues los cristales formados en la congelación aglutinan el antígeno. Si esto ocurre, debe descartarlo.
- Si el suero fue tratado con 2-ME verificar que el mismo no se encuentre gelificado, finalizada la incubación post tratamiento. Si gelifica, tratarlo nuevamente realizando una dilución previa ½ con solución fisiológica. Sueros hiperlipémicos gelifican con más facilidad en el tratamiento con 2-ME.
- La Azida de Sodio utilizada como conservador es toxica en caso de ingestión. En contacto con ácidos emite vapores tóxicos. Ocasionalmente, puede producir explosiones en contacto con iones metálicos. Por lo tanto, en caso de descarte por un sistema de desagüe, debe hacer fluir abundante agua.
- El Formol utilizado como conservador es tóxico por inhalación y es irritante en contacto con la piel y los ojos.
- El 2-Mercaptoetanol es tóxico en contacto con la piel, provoca quemaduras. Tiene olor característico desagradable por lo que es necesario manipularlo con protección respiratoria o bajo sistema de extracción de aire.
- Evitar cualquier contacto de la piel y mucosa con todos los reactivos. En caso de contacto con los ojos, lavar inmediata y abundantemente con agua. Tras contacto con la piel, lavar con abundante agua. Siempre use para su protección guantes, lentes, guardapolvos, etc.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antígeno coloreado (frasco N° 1): antes de usar, asegurar una buena homogeneización, agitando intensamente el frasco y luego pasando su contenido 3 ó 4 veces a través de una jeringa con aguja fina (58/8). Repetir el procedimiento cada vez que lo use. Mantener el frasco en posición vertical.

Diluyente de Muestras (frasco N° 2): antes de utilizar el Diluyente, agregar 100 microlitros de Solución Proteica (frasco N° 4), cada 10 ml de Diluyente. Preparar la cantidad necesaria para el uso inmediato, ya que solo es estable durante dos días si se mantiene entre 2 y 8 °C.

2-Mercaptoetanol (Ampolla N° 3): preparar una solución de 2-ME 1/100 en Solución fisiológica (ClNa 0,85% P/V). (Ver Advertencias y Precauciones). Utilizar esta solución solamente el día de su preparación.

Control Positivo y Negativo (frascos N° 5 y 6): están listos para usar por lo tanto no requieren tratamiento con 2-ME. Los controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para HBsAg y para anticuerpos contra HCV, HIV y Anticuerpos contra el Trypanosoma cruzi adecuadamente inactivado. Sin embargo, todos los derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Emplear suero fresco y límpido. La sangre se extraerá de un paciente en ayunas siguiendo las normas generales, recogiéndola en tubos de centrifuga. Para obtener el suero dejar coagular la sangre, centrifugar y separar el sobrenadante.

Los sueros pueden ser conservados entre 2 y 8 °C hasta 48 horas, o congelados a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

PROCEDIMIENTO

a) Tratamiento del suero con 2-ME

Los Controles Positivo y Negativo provistos en el kit están listos para usar, por lo tanto no deben ser sometidos al tratamiento con 2-ME.

1. En dos recipientes adecuados colocar:

	Suero tratado (AD 2-ME)	Suero no tratado (AD)
Suero	0,1 ml	0,1 ml
Solución 2-ME 1/100 (ver Preparación de los Reactivos)	0,1 ml	
Solución fisiológica		0,1 ml

2. Incubar 30 minutos a 37 °C.
3. Luego de la incubación, proceder a la titulación. Observar que ninguno se encuentre gelificado. (Ver Advertencias y Precauciones).
4. Los sueros estarán diluidos 1/2.

b) Titulación

Si desea investigar IgG específica, titular solamente el suero tratado con 2-ME.

Si desea diferenciar una infección reciente de una crónica titular el suero tratado y no tratado en paralelo.

1. Colocar 25 µl de Diluyente de Muestras (ver preparación de reactivos) utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada, a partir del primer pocillo de una policubeta descartable. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios hasta la dilución (título) de las muestras y controles que desea investigar. Dejar un pocillo solo con Diluyente de Muestras para utilizarlo como Control de Reactivo.
2. Sumergir un microdiluidor de 25 µl en un recipiente con agua destilada, secarlo con papel de filtro por rotación y seguidamente tomar el suero diluido en el tratamiento anterior. Al retirarlo controlar que cubra la totalidad de los espacios libres.
3. Sumergir el microdiluidor cargado en el 1° pocillo y girar el mismo entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta homogeneización de la muestra.

4. Transferir los microdiluidores a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada.
5. Retirar los microdiluidores y secarlos con papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.
6. Repetir los pasos 2 a 5 con cada muestra a investigar, con el Control Positivo (ver Precauciones y Advertencias) y el Control Negativo provistos en el kit.
Si utiliza una micropipeta automática de 25 μl para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizar por carga y descarga, transfiriendo 25 μl de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25 μl .
7. Depositar con una micropipeta o microgotero 25 μl de Antígeno previamente homogeneizado (ver Preparación de los Reactivos) en los pocillos utilizados.
8. Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
9. Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante un mínimo de cuatro horas y leer.

LECTURA

Luego de transcurridas cuatro horas de incubación, realizar una primera lectura y controlarla al día siguiente. La lectura debe realizarse sobre un “**fondo blanco**” o en espejo para policubetas. El primer pocillo corresponde a la dilución $\frac{1}{4}$ para el suero y $\frac{1}{2}$ para los Controles Positivo y Negativo.

REACCIÓN POSITIVA: formación de un manto coloreado en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

REACCIÓN NEGATIVA: formación de un botón nítido coloreado o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

CONTROL DE REACTIVO: debe formar un botón nítido coloreado por sedimentación del antígeno, como la Reacción Negativa. Si el Antígeno está autoaglutinado, la imagen del Control de Reactivo sería como la Reacción Positiva. Si esto ocurre, verifique la homogeneización del antígeno, su estado de conservación (debido a un posible congelamiento), y la fecha de vencimiento del Kit.

CRITERIO DE ACEPTABILIDAD DEL ENSAYO

La inclusión de un Control Positivo y Negativo permite verificar la reproductibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y llamar la atención sobre posibles errores de técnica.

El título del Control Positivo se indica en su correspondiente etiqueta y no debe variar más de un orden de dilución (± 1 título) durante todo el período de vigencia del kit. (Ver Advertencias y Precauciones).

El Control Negativo debe dar reacción negativa durante todo el período de vigencia del kit.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El **título del suero** será la inversa de la dilución que da lugar a un manto que ocupe 50% o más del pocillo.

Individuos no parasitados

Título suero no tratado (AD): pueden tener títulos de 8 a 128. Menos frecuentemente 256 y 512.

Título suero tratado (AD 2-ME): título inferior a 8.

En la reacción de AD las inmunoglobulinas “inespecíficas” podrían provocar aglutinaciones que habitualmente son de título bajo. Estas aglutininas presentes en individuos no parasitados, son polímeros que, al igual que las IgM específicas, se fraccionan por la acción del 2-ME y pierden su

capacidad aglutinante. Si un título en la AD (1/16 a 1/128 o menos frecuentemente 1/256 1/512) desaparece o cae a cifras no significativas (1/2; 1/4) después de incubado con 2-ME, el suero pertenecería a una persona no infectada. Como estos resultados podrían darse en una parasitosis muy recientemente adquirida, debería realizarse un nuevo examen 4 semanas después, en embarazadas y en pacientes en los que se sospecha la existencia de una infección. En el caso de un no infectado, los títulos se mantendrían semejantes a los del primer estudio; en el caso de un infectado reciente se comprobará un ascenso franco de la AD, mientras persistirá la caída significativa de la AD 2-ME.

Individuo parasitado crónico

Título suero no tratado (AD): 8 o mayor

Título suero tratado (AD 2-ME): 8 o mayor

Si el título del suero no tratado (AD) no se modifica al ser tratado con 2-ME (AD 2-ME) o la variación es de 1 a 3 títulos, el suero pertenecería a un paciente con infección crónica (o antigua) y el poder aglutinante estaría relacionado con anticuerpos del tipo IgG que no modifican su capacidad aglutinante después del tratamiento con 2-ME.

Individuo parasitado agudo

Título suero no tratado (AD): superior a 512

Título suero tratado (AD 2-ME): menor que 8 o inferior en 4 o más diluciones respecto al título obtenido en AD.

Si el suero no tratado (AD) posee títulos superiores a 512 y disminuye en 4 o más diluciones en el suero tratado (AD 2-ME), el poder aglutinante estaría relacionado con anticuerpos tipo IgM específicos y por tanto estaríamos en presencia de un individuo con infección reciente.

Esquema de la interpretación de los resultados

	Individuo no Parasitado	Individuo parasitado crónico	Individuo parasitado agudo
Título del suero no tratado (sin 2-ME)	8 a 128 (menos frecuentemente 256 ó 512)	≥ 8	> 512
Título del suero tratado (con 2-ME)	< 8	≥ 8 sin variación de título, o con una variación de uno a tres títulos inferiores con respecto al suero no tratado (sin 2-ME)	< 8 o títulos inferiores en 4 o más diluciones con respecto al suero no tratado

En estas infecciones una determinación aislada es poco significativa, por eso es importante estudiar una nueva muestra cada 4 semanas que permita evidenciar variaciones en el título, especialmente en los siguientes casos:

- Reacción Negativa en mujeres durante el período de gestación para evidenciar una posible primoinfección, que podría inducir malformaciones congénitas en el feto.
- Reacción Positiva con título tan alto como 2048 que puede evidenciar presumiblemente una infección activa o pertenecer a pacientes crónicos asintomáticos.
- Reacción Negativa o Positiva en pacientes inmunosuprimidos para evidenciar una posible primoinfección o una reactivación de la infección.

En estos casos deberá conservar alícuotas congeladas a -20 °C tomadas cada 4 semanas y procesarlas simultáneamente utilizando los mismos reactivos y el mismo operador.

Una variación de título en 3 o más diluciones entre las muestras tomadas cada 4 semanas indicarían presumiblemente una primoinfección o una reactivación.

Por el contrario, si no se observan variaciones en el título indicaría infección crónica asintomática o ausencia de infección.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

En estudios poblacionales con AD TOXO COLOR su sensibilidad resultó del 99% y su especificidad superior al 98%, considerando 8 como título diferencial entre un suero reactivo y uno no reactivo en la detección de IgG específica.

En una población serológicamente reactiva para anticuerpos anti-Toxoplasma gondii, por técnicas de IFI, HAI, EIA, el 97% de los sueros presentó títulos iguales o mayores a 32 y solo un bajo porcentaje, 3%, títulos de 8 o 16, cuando se estudiaron con AD 2-ME.

En una población serológicamente no reactiva para anticuerpos anti-Toxoplasma gondii, por técnicas de HAI, IFI, EIA, el 94% de los sueros presentó títulos inferiores a 4 y solo un 6% título igual a 4, cuando se estudiaron con AD 2-ME.

Por lo expuesto el título 8 para una muestra tratada con 2-ME sería el de máxima resolución entre sueros de individuos parasitados y no parasitados.

LIMITACIONES DEL MÉTODO

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. AD TOXO COLOR, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo ya que éste debe basarse en la correlación de los resultados de más de un test con los datos clínicos. En ese sentido, todo título debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Naot, Y.; Guptill, D. R.; and Remington, J. S.: Duration of IgM antibodies to Toxoplasma gondii after acute acquired toxoplasmosis. The Journal of Infectious Diseases. Vol. 142, N° 5. May 1982.
2. Desmonts, G.; Remington, J.S.: Direct agglutination test for diagnosis of Toxoplasma infection: Method for increasing sensitivity and specificity. J. of Clin. Microbiol. 2(6): 562-568 (1980).
3. Averbach, S.; Averbach, B.; Yanovsky, J.F.; Schmuñis, G.A.: Determinación de aglutininas en la fracción IgM como método simple en el inmunodiagnóstico de la Toxoplasmosis aguda. Medicina 35(5): 469-476 (1975).
4. Averbach, S.; Averbach, B.; Vilches, A.M.: Prevalencia de la infección por toxoplasma en personas aparentemente normales de Buenos Aires y alrededores. Pren. Méd. Argent. 61: 460-467 (1974).
5. Fulton, J.D.: Micro-agglutination test for Toxoplasma antibodies. Immunology 9: 491-495 (1965).
6. Fulton, J.D. and Voller, A.: Evaluation of immunofluorescent and direct agglutination methods for detection to specific Toxoplasma antibodies. Brit. Med. J. 2: 1173-1175 (1964).

LABORATORIO LEMOS S.R.L.

Director Técnico: Jorge O. Carradori. Bioquím. y Farm.

Santiago del Estero 1162

C1075AAX. C.A.B.A. Argentina.

Telefax: (5411) 4304-2204/2374

E-mail: info@lab-lemos.com

www.lab-lemos.com

Autorizado por A.N.M.A.T. PM-1545-3.

USO PROFESIONAL-VENTA EXCLUSIVA
A LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS.

Industria Argentina