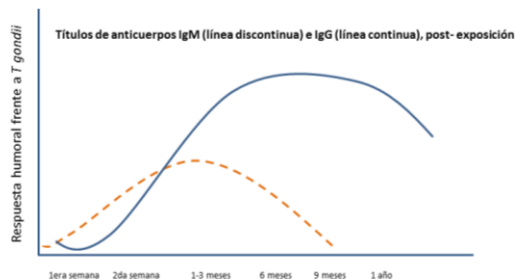


PARA SER USADO SOLO EN INVESTIGACIÓN

RELEVANCIA CLÍNICA

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado, ampliamente distribuido a nivel mundial, que puede infectar a todos los mamíferos y aves, a través de la ingesta de alimentos contaminados. La transmisión al humano ocurre a través de la ingestión de ooquistes presentes en las heces de gatos o en la carne infectada. Otra forma descrita de adquirir la infección es por la vía intrauterina, transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos. La infección por *T. gondii* en individuos inmunocomprometidos como por ejemplo en pacientes en fase de SIDA, puede tener serias repercusiones en los pacientes, mientras que en individuos inmunocompetentes usualmente es asintomática, aunque en algunos casos puede asociarse con cuadros de Uveítis. Las pruebas serológicas son las principales herramientas utilizadas para el diagnóstico de las diferentes fases de la infección. La fase aguda se caracteriza por la presencia de anticuerpos específicos contra *T. gondii* de tipo IgM, que pueden detectarse a partir de la 1^{era} semana posterior a la exposición y persistir hasta 6 meses, cuando usualmente comienza su descenso, seguidamente partir de la 2^{da} semana posterior a la infección, comienza a detectarse la IgG específica contra el *T. gondii*, con un pico a los 3 meses que puede mantenerse hasta 6 a 9 meses y comenzar un descenso lento a partir del año (ver figura 1).

Figura 1. Curso de la infección por el *T. gondii*



FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Las proteínas recombinantes: rSAG, rROP, rGRA, rMAG, del *T. gondii*, obtenidas en un sistema de expresión en *E. coli*, poseen gran capacidad para discriminar serológicamente a los individuos sanos y a los individuos expuestos al *T. gondii*. **La evaluación de la validez y seguridad diagnóstica muestra sensibilidad y valor predictivo negativo de 96%, así como especificidad y valor predictivo positivo por encima del 97%.** En este ensayo el suero problema se incubó con una placa recubierta con anti-IgM humana, una vez capturada la IgM del suero es expuesta a antígenos marcados con la enzima peroxidasa (HRP), reacción que se evidencia de forma directa por la reacción colorimétrica. **El ensayo permite la detección de anticuerpos tipo IgM específicos contra *T. gondii*.**

COMPOSICIÓN DEL KIT

- 1 placa de microtitulación de 96 pozos con anti-IgM humana
- 4 viales de 400 µL de suero control negativo. **Guardar a -20°C.**
- 4 viales de 400 µL de suero control positivo. **Guardar a -20°C.**
- 3 viales de 8 mL de solución diluyente de muestra (tapa azul).
- 3 viales de 4 mL de buffer de conjugado (tapa verde).
- 6 viales de conjugado (tapa blanca). **Guardar a -20°C.**
- 1 vial de 30 mL del reactivo W (**CONCENTRADO, 20X**).
- 1 vial de 5,5 mL del reactivo A (**CONCENTRADO, 2X**).
- 1 vial de 5,5 mL del reactivo B (**CONCENTRADO, 2X**).
- 2 viales de 5,5 mL de solución S.

ALMACENAMIENTO

- Almacenar el kit y sus componentes a 2-8 °C.
- **Almacenar los sueros controles positivos y negativos a -20 °C.**
- **Almacenar el conjugado a -20 °C.**
- No exponer los componentes del kit al sol, calor, o iluminación fuerte durante su almacenamiento/uso.
- Durante la realización del ensayo se sugiere extraer **solo el material requerido para el ensayo**, así evitar repetidas cambios de temperatura del Kit

MUESTRAS

Usar muestras de suero sin signos de lipemia, hemólisis o contaminación. Las muestras congeladas deben homogeneizarse antes de cada ensayo. Se sugiere evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que esto puede producir resultados falsos.

IMPORTANTE

- Nunca usar pool de sueros, pues esta es una mala práctica conduce a reportes de resultados negativos falsos.
- No utilizar reactivos o microplacas de lotes diferentes.
- Evitar pipetear repetidamente los reactivos en stock, pues esto puede causar contaminación.
- Se recomienda alicuotar el **reactivo A (alícuotas de 800 µL, suficiente para dos tiras y almacenar a 4°C y protegido de la luz)**. El pipeteo repetido del vial puede contaminarlo y en consecuencia pérdida de su actividad (este reactivo no es reemplazable).
- *T. gondii* ELISA contiene sueros de origen humano, seronegativos para VIH-1 y 2, VHC, y VHB. Debido a la posibilidad de falsos negativos y a la existencia de otros múltiples patógenos, se recomienda acatar estrictamente

las medidas de bioseguridad universales para el manejo de muestras biológicas.

PROCEDIMIENTO

1. Añadir a un pozo (**de referencia o blanco**) 200 µL de solución diluyente de muestra (tapa azul).
2. Añadir a un pozo 200 µL de control negativo.
3. Añadir a un pozo 200 µL de control positivo.
4. En el caso de las muestras problema: agregar en los pozos respectivos, **160 µL** de solución diluyente de muestra (tapa azul) y **40 µL** del suero problema, asegurarse de mezclarlo al menos 5 veces.
5. Incubar por **60 min a 37°C**.
6. Preparar el buffer W (20X). Por cada tira de 8 pozos se requieren ~50 mL, para ello tomar 2,5 mL de reactivo W (**CONCENTRADO, 20X**) y mezclar con 47,5 mL de agua destilada.
7. Preparar el conjugado. Anadir **1600 µL** del buffer del conjugado (tapa verde) en 1 vial del conjugado (tapa blanca), mezclar. **Una vez reconstituido almacenar a -20 °C**. Un vial reconstituido alcanza para 2 tiras de 8 pozos.
8. Realizar 6 lavados con buffer W.
9. Colocar 100 µL del conjugado por cada pozo, incluyendo el pozo blanco o de referencia.
10. Incubar por 60 min a 37°C.
11. Realizar 6 lavados con buffer W.
12. Preparar el sustrato inmediatamente antes de su uso, mezclando partes iguales del reactivo A (**CONCENTRADO, 2X**) con el reactivo B (**CONCENTRADO, 2X**). Por cada tira de 8 pozos se requiere un volumen total de 800 µL. **IMPORTANTE: debe prepararse solo lo necesario para cada ensayo y al momento de necesitarse, NO realizar la mezcla directamente en los pozos de la placa.**
13. Colocar 100 µL del sustrato por cada pozo.
14. Incubar por **20 min** a temperatura ambiente y en oscuridad.
15. Colocar 100 µL de solución S.
16. Leer la densidad óptica en un espectrofotómetro usando un filtro de **450 nm** y **620 nm** como filtro de referencia

CALCULO DE LOS RESULTADOS

1. En el primer ensayo deben incluirse: un blanco, el control negativo por duplicado y un pozo para el control positivo, de no hacerse, la interpretación de la prueba puede producir resultados falsos. Para los ensayos sucesivos, disponer un pozo para un blanco, para control positivo y control negativo.
2. El valor del **blanco o pozo de referencia** deber ser restado a los valores obtenido de las densidades ópticas de los controles y sueros problemas.
3. Determinar los valores promedio de los controles positivos y negativos.
4. Para que el ensayo sea válido, el valor promedio de los controles positivos (**MCP**) debe ser mayor o igual a 4,5 veces al valor promedio de los controles negativos (**MCN**). Es decir: **MCP / MCN = mayor de 4,5 y la relación debe mantenerse en los ensayos sucesivos**
5. Una vez determinada la validez del ensayo, calcular el valor del **punto de corte o cutoff**. Usar la fórmula: **Cutoff = 3 x MCN**.
6. Los valores de DO por encima del cutoff se consideran positivos. Los valores de DO por debajo del cutoff se consideran negativos. Los valores de DO muy cercanos al cutoff se consideran **indeterminados**, se recomienda repetir la prueba y/o hacer seguimiento al paciente. *Para ser considerado indeterminado el resultado de la división del suero problemas entre el MCN debe ser mayor de 2,9 y menor de 3*
7. **EJEMPLO:**
Resultados controles negativos: 0,070 y 0,080
Resultados controles positivos: 0,550 y 0,590
 $MCN = (0,070 + 0,080) / 2 = 0,075$
 $MCP = (0,550 + 0,590) / 2 = 0,570$
 $MCP / MCN = 0,570 / 0,185 = 6,7$
 $Cutoff = 3 \times 0,075 = 0,225$
Indeterminado: Suero problema / MCN = 0,220 / 0,075 = 2,9. En estos casos debe recomendarse, repetir el ensayo en 2-3 semanas

1. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. Methods Enzymol. 1980;70(A):419-39.
2. Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. Avances Biomed 2012; 1 (2), 73-81.
3. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, Candolfi E. Serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;84: 22-33