

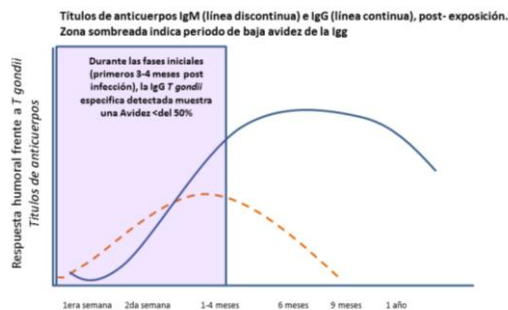
**PARA SER USADO SOLO EN INVESTIGACIÓN**

**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 Uveitis. 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<sup>era</sup> semana posterior a la exposición y persistir hasta 6 meses, cuando usualmente comienza su descenso, seguidamente partir de la 2<sup>da</sup> 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.

Debido a que la IgM puede persistir hasta 6 a 9 meses, en ocasiones se dificulta el diagnóstico de la infección aguda, es por ello que el uso de pruebas como el de la Aidez de la IgG, pudieran ser útil para complementar el diagnóstico, ya que la baja aidez de la IgG (<50%) es indicativo de que la infección ocurrió dentro de los 4 meses (ver figura 1). Su uso es recomendable como prueba confirmatoria de infección aguda

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 98%, así como especificidad y valor predictivo positivo por encima del 95%. En este ensayo los sueros problema se incuban por duplicado con los antígenos inmovilizados en placas de microtitulación, en presencia o ausencia del reactivo de Aidez, la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia de forma directa por la reacción colorimétrica. Las variación de las densidades ópticas de los sueros expuestos al reactivo de aidez, **permite diferenciar la IgG específica contra *T gondii* de alta aidez versus baja aidez.**

**COMPOSICIÓN DEL KIT**

- 1 placa de microtitulación de 96 pozos con proteínas rSAG, rROP, rGRA, rMAG
- 4 viales de 600 µL de suero control negativo. **Guardar a -20°C.**
- 4 viales de 600 µL de suero control positivo alta afinidad. **Guardar a -20°C.**
- 4 viales de 600 µL de suero control positivo baja afinidad. **Guardar a -20°C.**
- 4 viales de 8 mL de solución diluyente de muestra (tapa azul).
- 3 viales de 4 ml de **reactivo de aidez** (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 50 mL del reactivo W (**CONCENTRADO, 20X**).
- 1 vial de 5,5mL 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 por duplicado 200 µL de control negativo.
3. Añadir por duplicado 200 µL de control positivo de alta avidez.
4. Añadir por duplicado 200 µL de control positivo de baja avidez.
5. Colocar cada muestra por duplicado, en los pozos respectivos, agregando 200 µL de solución diluyente de muestra (tapa azul) en cada pozo y **10 µL** del suero problema mezclándolo al menos 5 veces.
6. Incubar por **45 min** a 37°C.
7. Preparar el buffer W. 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.
8. Realizar 3 lavados con buffer W.
9. Colocar en **uno de los pozos de cada duplicado** 200 µL del reactivo de avidez y en el otro duplicado 200 µL diluyente de muestra, e incubar por **30 min** a 37°C
10. Realizar 6 lavados con buffer W.
11. Preparar el conjugado. Anadir **1,9 mL** (1900 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
12. Realizar 6 lavados con buffer W.
13. Colocar 100 µL del conjugado por cada pozo, incluyendo el pozo blanco o de referencia.

**Nota importante:** Asegurarse que el conjugado añadido a cada muestra sean del **mismo vial** del conjugado reconstituido

14. Incubar por **45 min** a 37°C.
15. Realizar 6 lavados con buffer W.
16. Preparar el sustrato 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.**
17. Colocar 100 µL del sustrato por cada pozo.
18. Incubar por 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
19. Colocar 100 µL de solución S.
20. 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, los sueros controles positivos y negativos, por duplicado, 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 5 veces al valor promedio de los controles negativos (MCN). Es decir:  $MCP / MCN = \text{mayor de } 5$  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:  $Cutoff = 2,5 \times MCN$ .
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 v/o hacer seguimiento al paciente.

Para ser considerado indeterminado el resultado de la división del suero problemas entre el MCN debe ser mayor de 2,4 y menor de 2,5

EJEMPLO:

Resultados controles negativos: 0,152 y 0,130

Resultados controles positivos: 0,750 y 0,800

MCN = ( 0,152 + 0,130 ) / 2 = 0,141

MCP = ( 0,928 + 0,899 ) / 2 = 0,913

MCP / MCN = 0,913 / 0,141 = 6,47

Cutoff = 2,5 x 0,141 = 0,352

**Indeterminado:** Suero problema / MCN = 0,342 / 0,141 = 2,42. En estos casos debe recomendarse, repetir el ensayo en 3-4 semanas

#### CALCULO DE LOS AVIDEZ

Por cada muestra, se debe calcular el porcentaje de Aidez, que será determinado a través de los cambios de absorbancias observadas entre las muestras del mismo individuo, antes y después del tratamiento con **reactivo de aizdez**, aplicando la siguiente formula:

OD Muestra tratada con reactivo de Aidez X 100

$$\frac{\text{OD Muestra tratada con reactivo de Aidez} \times 100}{\text{OD Muestra No tratada}} = \% \text{ de Aidez}$$

Resultados	Definición
% de Aidez <50%	Baja aizdez
% de Aidez > 50%	Alta aizdez

Una Aidez elevada es indicativa de que la infección ocurrió en un tiempo mayor a 4 meses

- Rossi CL A simple, rapid enzyme-linked immunosorbent assay for evaluating immunoglobulin G antibody avidity in toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998 Jan;30(1):25-30
- Iqbal J, Khalid N. Detection of acute *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by IgG avidity and PCR analysis. *J Med Microbiol.* 2007 Nov;56(Pt 11):1495-9.
- Donis JH. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Avan Biomed* 2012; 1 (2), 73-81.
- 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