



Toxotest

HAI

Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra el *Toxoplasma gondii*

SIGNIFICACION CLINICA

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

Cuando la infección por *T. gondii* se adquiere durante la gestación, existe un alto riesgo de infección en el feto, pudiendo provocar abortos o lesiones graves que son más severas cuanto más precoz sea la contaminación materna. Las determinaciones serológicas son las más convenientes y certeras para el diagnóstico de la toxoplasmosis y debe establecerse: a) la seroconversión de negativo a positivo, b) un aumento en el título de anticuerpos y c) la presencia de IgM específica que indicaría infección activa.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Toxotest HAI se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*T. gondii* de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito. El empleo de ambos tipos de antígenos incrementa la sensibilidad del método permitiendo la detección precoz de la infección. Tanto la presencia de anticuerpos heterófilos como la aparición de IgM, características del período agudo de la parasitosis, se investigan empleando tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-ME) y eritrocitos no sensibilizados para control y absorción de heterofilia.

Los anticuerpos heterófilos se absorben con eritrocitos no sensibilizados. En los sueros de pacientes con infección aguda tratados con 2-ME, se observa una caída del título en por lo menos dos diluciones comparados con los mismos sueros sin tratar con 2-ME.

REACTIVOS PROVISTOS

Reconstituyente HAI: solución fisiológica tamponada a pH 7.

Antígeno HAI: liofilizado de glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de superficie de *T. gondii*.

GR no sensibilizados: suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados, para control y absorción de heterofilia.

Buffer HAI: solución fisiológica tamponada con fosfatos a pH 7,5, con colorante inerte.

Solución Proteica: solución de albúmina bovina.

2-Mercaptoetanol: ampolla conteniendo 2-mercaptoetanol (2-ME).

Control Positivo: suero inactivado conteniendo anticuerpos

contra el *Toxoplasma gondii*.

Control Negativo: suero no reactivo, inactivado.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Solución fisiológica.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Antígeno HAI: preparar con 5,2 ml de Reconstituyente HAI. Esperar una hora antes de usar agitando enérgicamente cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplea homogeneizar mediante agitación.

GR no sensibilizados: homogeneizar mediante agitación antes de usar, evitando la formación de espuma.

Diluyente de Sueros HAI: agregar 0,2 ml de Solución Proteica cada 10 ml de Buffer HAI. Mezclar, rotular y fechar.

2-Mercaptoetanol: una vez abierta la ampolla, trasvasar el contenido al frasco vacío provisto, el que se deberá tapar inmediatamente después de usar.

2-Mercaptoetanol al 1%: con el 2-ME provisto, preparar una dilución 1/100 con solución fisiológica en cantidad suficiente de acuerdo al número de pocillos que se utilicen. Ejemplo: para 96 pocillos: 25 ul de 2-ME en 2,5 ml de solución fisiológica.

Controles Positivo y Negativo: listos para usar.

PRECAUCIONES

- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección. Los controles se encuentran inactivados. Sin embargo, deben emplearse como si se tratara de material infectivo.
- Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y virus de inmunodeficiencia humana (HIV) encontrándose no reactivos.
- Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos. El método recomendado para este procedimiento es autoclavar durante 1 hora a 121°C. Los líquidos de desecho pueden ser desinfectados con hipoclorito de sodio (concentración final 5%) durante por lo menos 60 minutos.
- No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.
- No emplear reactivos de otro origen.
- Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

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

Diluyente de Sueros HAI: es estable en refrigerador (2-10°C) 5 días a partir de la fecha de su preparación.

GR no sensibilizados: mantener en posición vertical.

2-Mercaptoetanol al 1%: usar inmediatamente después de preparado.

Antígeno HAI: una vez reconstituido es estable durante 4 meses conservado en refrigerador (2-10°C). No congelar. Mantener en posición vertical.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el Control Negativo y todas las diluciones de sueros son reactivas, puede ser indicio de autoaglutinación del Antígeno HAI. Verificar destinando un pocillo de la policubeta para mezclar Antígeno HAI y Diluyente de Sueros HAI, sin la muestra. Si aún en este caso se observa aglutinación, el reactivo estará deteriorado. Desechar.

La ausencia de reactividad en todas las diluciones de sueros y Control Positivo, puede ser indicio de deterioro de los reactivos. Procesar una muestra con positividad conocida.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: el paciente debe estar preferentemente en ayunas. Obtener suero de la manera usual. No usar plasma.

b) Aditivos: no se requieren. No agregar conservadores.

c) Sustancias interferentes conocidas: hemólisis o hiperlipemia (con quilomicronemia) son causa de resultados erróneos.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en refrigerador (2-10°C) durante no más de 72-96 horas contadas a partir del momento de la extracción. Para períodos más prolongados de conservación, congelar (a -20°C) evitando reiterar descongelamientos y congelamientos.

Los sueros envejecidos tienden a gelificarse al contacto con el 2-ME, provocando resultados falsos positivos.

MATERIAL REQUERIDO

1- Provisto

- 1 frasco vacío (para trasvasar el 2-ME de la ampolla)
- 5 policubetas con 96 pocillos de fondo en U (8 hileras y 12 columnas)

2- No provisto

- microdilutores (25 ul)
- microgoteros (25 ul)
- tubos de ensayo y material volumétrico adecuado
- cinta adhesiva

PROCEDIMIENTO

Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U. Pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta antes de usar, colocarla en forma apaisada sobre el trapo y realizar el ensayo manteniéndola en esta posición. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

I- TITULACION SIN 2-ME

1) Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.

2) Tomar una alícuota de cada suero o controles a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra) y colocar en los pocillos de la columna 1. Se utilizarán tantas hileras horizontales como sueros o controles deban procesarse.

3) Realizar diluciones a partir de la columna 1 (dilución 1/2), pasando los microdilutores a la columna 2 (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la columna 6 (dilución 1/64).

Si se procesaran más de 8 sueros, se utilizarán las columnas 7 a 12, realizando las diluciones de la manera antes descrita.

4) Colocar en las columnas 1 y 2 (diluciones 1/2 y 1/4) una gota (25 ul) de GR no sensibilizados, para control de heterofilia. Hacer lo mismo en las columnas 7 y 8 en caso de ser empleadas.

5) En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.

6) Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos.

7) Dejar en reposo, al resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.

8) A partir de los 90 minutos, leer.

Se puede aumentar la nitidez de la imagen, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

II- TITULACION CON 2-ME

1) Colocar 50 ul de suero o controles en cada uno de los pocillos de la columna 1 (y 7 si es necesario) empleando micropipeta volumétrica adecuada (utilizar una punta o tip por cada suero).

2) Agregar 50 ul de 2-Mercaptoetanol al 1% a los mismos pocillos (utilizar una única punta o tip de la micropipeta).

3) Sellar los pocillos con cinta adhesiva y agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales.

4) Incubar 30-60 minutos a 37°C o 90 minutos a temperatura ambiente.

5) Retirar la cinta adhesiva, pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta y, con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Suero HAI en los pocillos restantes de las hileras utilizadas.

6) Realizar los pasos 3 al 8 descriptos en la Titulación I.

III- TECNICAS ALTERNATIVAS

Cuando se estudian sueros altamente reactivos o en caso de poblaciones con una elevada prevalencia de toxoplasmosis donde habitualmente se encuentran títulos superiores a 1/32 pueden emplearse algunas de las siguientes técnicas alternativas:

Técnica alternativa 1:

Continuar con las diluciones hasta la columna 12 inclusive con lo que se obtiene una dilución final de 1/4.096.

Técnica alternativa 2:

Colocar en un tubo "ad-hoc" 50 ul de suero y 350 ul de Diluyente de Sueros HAI (dilución 1/8). Tomar 25 ul de esta dilución y colocarla en la columna 1 de la policubeta. Proseguir según se describe en I, hasta la columna 6. De esta forma se obtiene una dilución final de 1/512.

IV- ABSORCION SOBRE GLOBULOS ROJOS NO SENSIBILIZADOS

En sueros que presenten heterofilia los anticuerpos heterófilos pueden absorberse sobre GR no sensibilizados de la siguiente forma: en un tubo de hemólisis con tapón colocar 50 ul de GR no sensibilizados provistos + 50 ul de suero en ensayo. Dejar la suspensión durante 30 minutos a 37°C agitando de tanto en tanto. Luego centrifugar a 2.000 r.p.m. durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 50 ul y se emplea como dilución 1/2, colocándola en la primera columna. Si se emplea en titulación con 2-ME esta columna corresponde a dilución 1/4.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Titulación sin 2-ME

Títulos ≥ 16 significan mayor probabilidad de infección toxoplásmica. A fin de determinar una primoinfección reciente deben procesarse 2 muestras tomadas con un intervalo de 2-3 semanas. Un aumento de título mayor de 2 diluciones entre la 1^{ra} y 2^{da} muestra indican infección recientemente adquirida.

Titulación con 2-ME

La aparición de títulos bajos en la titulación sin 2-ME y reactividad con glóbulos rojos no sensibilizados que desaparece al efectuar la titulación con 2-ME y/o absorción con GR no sensibilizados, serían indicativos de la existencia de heterofilia. Por el contrario, títulos elevados sin el empleo de 2-ME que disminuyen considerablemente al utilizar 2-ME indicarían la presencia de IgM, característica de infección aguda. Los controles de heterofilia en este caso deben dar reacción negativa en el suero sin tratar o tras absorción con GR no sensibilizados.

IMAGEN NEGATIVA



IMAGEN POSITIVA



(1)

(2)

(1) Manto.

(2) Punto final (50%).

No Reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón o pequeño anillo de bordes regulares.

Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% o más del fondo de los pocillos.

VALORES DE REFERENCIA

Dentro de las técnicas inmunológicas, la HAI es considerada un método confiable para la determinación de anticuerpos específicos. No obstante, sus resultados, al igual que los de cualquier método serológico, sólo constituyen un dato auxiliar para el diagnóstico.

Es por esta razón que los informes deben ser considerados en términos de probabilidad. En este caso, mayor o menor probabilidad de parasitosis por *T. gondii*.

Se consideran presumiblemente parasitados aquellos individuos cuyos sueros son reactivos en diluciones mayores o iguales a 1/16.

Se debe tener en cuenta que la concentración de anticuerpos en suero varía en distintas poblaciones, razón por la cual es posible encontrar sueros reactivos correspondientes a individuos no parasitados. Por esta razón es necesario determinar los valores de referencia de la población en estudio.

LIMITACIONES DE PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Otras causas de resultados erróneos son:

- Falta de acondicionamiento previo de la policubeta. Para eliminar la carga electrostática es necesario pasar un trapo húmedo por la base (ver PROCEDIMIENTO).
- Falta de homogeneización de los reactivos antes de su uso.
- Deficiencias de mezclado.
- Vibraciones accidentales durante el reposo necesario para el desarrollo de la reacción.
- Sueros envejecidos o congelados y descongelados repetidamente.
- Contaminaciones accidentales de los reactivos o del material empleado en el ensayo.
- Policubetas rayadas por uso reiterado. No se aconseja reutilizar pocillos.
- Diluyente de Sueros HAI conservado más de 5 días.
- Exceso o defecto de Diluyente de Sueros HAI en los pocillos de la policubetas.
- No respetar los tiempos y temperaturas de incubación en el tratamiento con 2-ME al 1%.
- 2-Mercaptoetanol al 1% no preparado en el momento. Debe tenerse en cuenta que en este tipo de infecciones las titulaciones aisladas proveen escasa información por lo que se prefiere efectuar determinaciones seriadas cada 15-20 días que permitan observar las variaciones en los títulos. Para este procedimiento es conveniente conservar congeladas alícuotas de las muestras de distintos días y procesarlas simultáneamente con los mismos reactivos y el mismo operador.

Recordar que cada componente de **Toxotest HAI** forma un equipo completo que debe considerarse como unidad. Por este motivo no deben intercambiarse los componentes de distintos equipos.

PRESENTACION

- 80 determinaciones (Cód. 1743201).


BIBLIOGRAFIA


- Gomez Lus, R. y Benito Ruesca, R. - Medicine 33-2ª serie
- pág. 1.459 (1984).
- Jacobs, L.; Linde, M.N. - J. Parasitol. 43:308, (1957).

EXPLICACION DE LOS SIMBOLOS

Antígeno	HAI	Buffer	HAI
Antígeno HAI		Buffer HAI	
Reconstituy.	HAI	GR	no sensibil.
Reconstituyente HAI		GR no sensibilizados	
Sol.	Proteica	2-ME	
Solución Proteica		2-Mercaptoetanol	
Control	+	Control	-
Control Positivo		Control Negativo	

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"


 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 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

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 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.
Disp. N°: 195/90



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina