

INTENCIÓN DE USO

El kit Toxoplasma IgG ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgG de Toxoplasma en suero o plasma humano.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El Toxoplasma Gondii es un parásito (protozoo) que causa Toxoplasmosis, una enfermedad común que afecta entre 30 y 50 de cada 100 personas adultas en Estados Unidos. La principal fuente de contagio es el contacto directo con heces felinas o la ingesta de alimentos poco cocidos o crudos. La Toxoplasmosis generalmente presenta síntomas leves en individuos inmuno competentes, sin embargo, en pacientes inmuno comprometidos, la infección puede traer serias consecuencias. Toxoplasmosis aguda en mujeres embarazadas puede acarrear abortos, poco crecimiento del feto, parto prematuro, o muerte fetal. El tratamiento en la mujer embarazada infectada puede prevenir y aliviar la enfermedad en el nonato. El tratamiento de un niño infectado también aliviara la severidad de la enfermedad cuando el paciente crezca. Los anticuerpos. IgG e IgM al Toxoplasma pueden ser detectados entre dos y tres semanas con posterioridad al contagio. El IgG permanece positivo, y con el tiempo los niveles de anticuerpo decrecen. Mediante ELISA puede detectarse anticuerpo IgM a Toxoplasma un año después de la infección, en más del 50% de los pacientes. Por lo tanto, los resultados positivos IgM deben ser evaluados con una o dos muestras, si se sospecha de infección en curso.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgG específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgG específico en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos antígeno Toxoplasma	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare la solución de lavado 1X agregando el contenido de la botella (25X) a 475 mL de agua destilada o desionizada. Almacene a temperatura ambiente (18-26°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

EJEMPLO DE MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de Toxoplasma IgG; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de Toxoplasma IgG por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de Toxoplasma IgG por ELISA

PERFORMANCE

1. Sensibilidad y Especificidad:

360 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 124 sueros resultaron positivos y 218 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 95%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Toxoplasma IgG ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	124	8	132
-	10	218	228
Total	134	226	360

2. Precisión:

Estudio Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	16	1.93	0.08	4.06
2	16	0.45	0.03	6.66
3	16	0.12	0.01	8.33

Estudio Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	10	2.15	0.25	11.62
2	10	0.44	0.02	0.545
3	10	0.10	0.01	10.00

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico
2. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

REFERENCIAS

1. Wilson M; Remington JS; Clavet C; Varney G; Press C; Ware D. Evaluation of six commercial kits for detection of human immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii. The FDA Toxoplasmosis Ad Hoc Working Group.
2. Obwaller A; Hassl A; Picher O; Aspöck H. An enzyme-linked immunosorbent assay with whole trophozoites of Toxoplasma gondii from serum-free tissue culture for detection of specific antibodies. Parasitol Res 1995; 81(5):361-4.
3. Loyola AM; Durighetto AF Jr; Silva DA; Mineo JR. Anti-Toxoplasma gondii immunoglobulins A and G in human saliva and serum. J Oral Pathol Med 1997; 26(4):187-91.
4. Doehring E; Reiter-Owona I; Bauer O; Kaisi M; Hlobil H; Quade G; Hamudu NA; Seitz HM. Toxoplasma gondii antibodies in pregnant women and their newborns in Dar es Salaam, Tanzania. Am J Trop Med Hyg 1995; 52(6):546-8.
5. Cotty F; Descamps P; Body G; Richard-Lenoble D. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: the role of Toxoplasma IgA antibodies in amniotic fluid [letter]. J Infect Dis 1995; 171(5):1384
6. Altintas N; Kuman HA; Akisu C; Aksoy U; Atambay M. Toxoplasmosis in last four years in Aegean region, Turkey. J Egypt Soc Parasitol 1997; 27(2):439-43.