

# Toxo IgM

## Anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii (ELISA)

### Uso Previsto:

El ensayo Toxo IgM es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii en suero y plasma humanos.

### Resumen: 1-7

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria causada por Toxoplasma gondii. Las infecciones por toxoplasmosis generalmente no causan síntomas evidentes en adultos. Ocasionalmente, las personas pueden tener algunas semanas o meses de una enfermedad leve similar a la gripe, como dolores musculares y ganglios linfáticos sensibles. En un pequeño número de personas, se pueden desarrollar problemas en los ojos. En aquellos con un sistema inmunitario débil, pueden presentarse síntomas graves como convulsiones y falta de coordinación. Si se infecta durante el embarazo, una afección conocida como toxoplasmosis congénita puede afectar al niño.

Hasta la mitad de la población mundial está infectada por toxoplasmosis, pero no tiene síntomas. En los Estados Unidos, alrededor del 23% se ven afectados y en algunas áreas del mundo esto llega hasta el 95%. Alrededor de 200.000 casos de toxoplasmosis congénita ocurren al año.

El diagnóstico de toxoplasmosis en humanos se realiza por métodos biológicos, serológicos, histológicos o moleculares. Las pruebas serológicas pueden detectar Toxo. gondii en suero sanguíneo, usando métodos que incluyen la prueba de colorante Sabin-Feldman (DT), el ensayo de hemaglutinación indirecta, el ensayo de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFA), la prueba de aglutinación directa, la prueba de aglutinación de látex (LAT), la prueba ligada a enzimas ensayo inmunoabsorbente (ELISA), y la prueba de ensayo de aglutinación inmunoabsorbente (IAAT).

Las pruebas más utilizadas para medir anticuerpos IgG son la DT, ELISA, IFA y la prueba de aglutinación directa modificada. Los anticuerpos IgG generalmente aparecen dentro de una semana o dos de la infección, alcanzan su punto máximo dentro de uno o dos meses y luego disminuyen a diferentes velocidades. Los anticuerpos IgG contra el toxoplasma generalmente persisten de por vida y, por lo tanto, pueden estar presentes en el torrente sanguíneo como resultado de una infección actual o previa.

### Principio de Prueba:

Duración total del ensayo: 70 minutos.

Este kit utiliza el principio ELISA de captura para detectar Toxo IgM. Las tiras de micropocillos de poliestireno están recubiertas previamente con IgM anti-humana de ratón (específica de cadena anti- $\mu$ ). Durante el primer paso de incubación, todos los anticuerpos IgM se unen al anticuerpo monoclonal IgM antihumano de ratón recubierto en la microplaca, incluido el Anti-Toxo IgM, los pocillos se lavan para eliminar las proteínas séricas no unidas y los antígenos Toxo conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP- conjugado) se agregan. Durante el segundo paso de incubación, si hay anticuerpos Toxo IgM en la muestra, los antígenos conjugados con HRP se unirán a los complejos anti-Toxo IgM humanos formados previamente y el conjugado de HRP no unido se eliminará mediante lavado. Las soluciones de cromógeno que contienen tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de urea se agregan a los pocillos y, en presencia del inmunocomplejo de anticuerpo IgM antihumano (antígeno IgM (HRP), los cromógenos incoloros son hidrolizados por el conjugado de HRP unido a un color azul). producto El color azul se vuelve amarillo después de detener la reacción con ácido sulfúrico.

La cantidad de intensidad de color se puede medir y es proporcional a la cantidad de anticuerpo capturado en los pocillos y a la cantidad de anticuerpo en la muestra, respectivamente.

### Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 11,0 ml de HRP (peroxidasa de rábano picante) marcado con antígenos Toxo IgM. Contiene 0,1% de conservante ProClin300.
- Diluyente de muestra, 1 vial, 11 ml, listo para usar.
- Control Positivo, 1 vial, 0,2 mL.
- Control negativo, 1 vial, 0,2 mL.
- Sustrato, 1 vial, 11mL, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 mL de ácido sulfúrico 1 mol/L.

- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

### Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50  $\mu$ L con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
- La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.
- Algunos reactivos contienen 0,05 % o 0,1 % de ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstresele la etiqueta o el envase.
- El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
- Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
- No fume, beba, coma ni se aplique cosméticos en el área de trabajo.
- No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
- Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.

### Almacenamiento y Estabilidad:

- Almacenar a 2-8°C.
- Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

### Recolección y Preparación de Muestras:

- Se recomienda suero o plasma humano para esta prueba.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
- No utilice muestras inactivadas por calor.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

### Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

### Procedimiento de Prueba:

Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.

• **Preparación:** Identifique dos pocillos como control negativo (p. ej., B1, C1), dos pocillos como control positivo (p. ej., D1, E1) y un blanco (p. ej., A1, no se deben añadir muestras ni conjugado HRP en el pocillo de blanco). Si los resultados se determinarán mediante el uso de un lector de placas de doble longitud de onda, se podrá omitir el requisito de uso del pozo en blanco. Use solo la cantidad de tiras requeridas para la prueba.

• **Adición de Diluyente de Muestras:** agregue 100 µL de diluyente de muestras en sus respectivos pocillos, excepto en el blanco.

• **Adición de Muestra:** agregue 10 µL de control positivo, control negativo y muestra en sus respectivos pocillos excepto el blanco. Mezclar golpeando suavemente la placa. Utilice una punta de pipeta de eliminación separada para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.

**Nota:** Después de agregar la muestra, los reactivos en los pocillos cambian de color azul a verde.

• **Incubación:** cubra la placa con la tapa de la placa e incube durante 30 minutos a 37°C.

• **Lavado:** Al final de la incubación, retire y deseche la cubierta de la placa. Lave cada pocillo 5 veces con solución de lavado diluido. Cada vez, permita que los micropocillos se empapen durante 30 a 60 segundos. Después del último ciclo de lavado, coloque el plato sobre papel secante o una toalla limpia y golpéelo suavemente para eliminar los restos.

• **Adición de Conjugado:** agregue 100 µL de conjugado en cada pocillo excepto en el blanco.

• **Incubación:** cubra la placa con la tapa de la placa e incube durante 30 minutos a 37°C.

• **Lavado:** Al final de la incubación, retire y deseche la cubierta de la placa. Lave cada pocillo 5 veces con solución de lavado diluido. Cada vez, permita que los micropocillos se empapen durante 30 a 60 segundos. Después del último ciclo de lavado, coloque el plato sobre papel secante o una toalla limpia y golpéelo suavemente para eliminar los restos.

• **Coloración:** agregue 100 µL de sustrato en cada pocillo, incluido el blanco. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos evitando la luz. La reacción enzimática entre el sustrato TMB y el conjugado HRP produce un color azul en el control positivo y en los pocillos de muestras positivas.

• **Parada:** Usando una pipeta multicanal o manualmente, agregue 50 µL de solución de parada en cada pocillo y mezcle suavemente. Se desarrolla un color amarillo intenso en los pocillos de muestras positivas de control positivo y Toxo IgM.

• **Medición:** Calibre el lector de placas con el pocillo en blanco y lea la absorbancia a 450 nm. Si se utiliza un instrumento de doble filtro, establezca la longitud de onda de referencia en 630 nm. Calcule el valor de corte y evalúe los resultados. (Nota: lea la absorbancia dentro de los 10 minutos después de detener la reacción).

### Control de Calidad y Cálculo:

• Lea la densidad óptica (DO) de la muestra a 450 nm con un lector de microplacas.

• Valor medio de la DO del control negativo  $\leq 0,1$  y valor de la DO del control positivo  $\geq 0,8$ , la prueba es válida; de lo contrario, la prueba no es válida.

• Valor de Corte, Cut-Off (C.O.) = Valor medio de la DO del control negativo + 0,10 (Calculado por 0,05 cuando el valor medio de la DO del control negativo es  $\leq 0,05$ , calculado por el valor real cuando el valor medio de la DO del control negativo es  $> 0,05$ ).

### Resultados Positivos: Valor de D.O. de la Muestra $\geq$ C.O.

Las muestras que arrojan una absorbancia igual o mayor que el valor de corte se consideran inicialmente reactivas, lo que indica que probablemente se haya detectado Toxo IgM usando ELISA Toxo IgM. Todos los especímenes inicialmente reactivos deben volver a analizarse por duplicado utilizando Toxo IgM ELISA antes de la interpretación final de los resultados del ensayo. Las muestras repetidamente reactivas pueden considerarse positivas para Toxo IgM con Toxo IgM ELISA.

### Resultados Negativos: Valor de DO de la Muestra $<$ C.O.

Las muestras que arrojan una absorbancia inferior al valor de corte son negativas para este ensayo, lo que indica que no se ha detectado Toxo IgM con el ELISA Toxo IgM, por lo tanto, es probable que el paciente no esté infectado con Toxo y la sangre no contiene Toxo IgM.

### Limitaciones:

- Los resultados positivos deben confirmarse con otro método disponible e interpretarse junto con la información clínica del paciente.
- El diagnóstico clínico no debe establecerse en base a un solo resultado de prueba. Debe integrar datos y hallazgos clínicos y de laboratorio.

### Características de Rendimiento Específico:

Se probó un estudio de 216 personas con kits ELISA y se encontró que la especificidad era del 99,05 %.

### Sensibilidad:

Entre las 181 Toxo IgM confirmadas que dieron positivo cuando se analizaron con este ELISA, y 180 muestras de las cuales se detectaron con positivo, la sensibilidad fue del 99,45 %.

### Precisión:

#### Intra-Ensayo:

CV  $\leq 15$  %

La precisión dentro de la serie se ha determinado mediante el uso de 15 réplicas de tres muestras: un positivo bajo, un positivo medio y un positivo alto.

#### Inter-Ensayo:

CV  $\leq 20$  %

La precisión entre ejecuciones se ha determinado mediante 3 ensayos independientes en las mismas tres muestras: un positivo bajo, un positivo medio y un positivo alto. Se analizaron tres lotes diferentes del kit de prueba ELISA Toxo IgM utilizando estas muestras durante un período de 5 días.

### Especificidad Analítica:

• No se observan interferencias hasta una concentración de 1 mg/mL de Acetaminofén, 0,2 mg/mL de Ácido Gentísico, 0,1 mg/mL de Ácido Ascórbico, 0,1 mg/mL de Ácido Acetosalisílico, 0,1 mg/mL de Cafeína, 0,6 mg/mL de Ácido Oxálico, 2 mg/ml de bilirrubina, 2 mg/ml de hemoglobina y 1 % de etanol.

• Los factores reumatoides no interfieren con la prueba.

• No se observa reactividad cruzada en muestras positivas para Toxo IgG, sífilis, HBsAg, VHC, RF y HCG.

### Referencia:

1. "Parásitos - Enfermedad de toxoplasmosis (infección por toxoplasma)". 10 de julio de 2014. Archivado desde el original el 22 de agosto de 2015. Consultado el 22 de agosto de 2015.
2. Cazador, CA; Sibley, LD (noviembre de 2012). "Modulación de la inmunidad innata por efectores de virulencia de *Toxoplasma gondii*". *Nature Reviews Microbiología*. 10 (11): 766–78. doi:10.1038/nrmicro2858. PMC 3689224. PMID 23070557.
3. "Parásitos: epidemiología y factores de riesgo de la toxoplasmosis (infección por toxoplasma)". 26 de marzo de 2015. Archivado desde el original el 23 de agosto de 2015. Consultado el 22 de agosto de 2015.
4. Torgerson, Paul R; Mastroiacovo, Pierpaolo (2013). "La carga global de la toxoplasmosis congénita: una revisión sistemática". *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*. 91 (7): 501–508. doi:10.2471/BLT.12.111732. ISSN 0042-9686. PMC 3699792. PMID 23825877.
5. Flegel J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH (marzo de 2014). "Toxoplasmosis: una amenaza global. Correlación de la toxoplasmosis latente con la carga de enfermedad específica en un conjunto de 88 países". *Más uno*. 9 (3): e90203. Código Bib:2014PLoSO...990203F. doi:10.1371/journal.pone.0090203. PMC 3963851. PMID 24662942. La toxoplasmosis se está convirtiendo en un peligro para la salud mundial, ya que infecta al 30-50% de la población humana mundial.
6. Jones JL, Parise ME, Fiore AE (2014). "Infecciones parasitarias desatendidas en los Estados Unidos: Toxoplasmosis". *Revista americana de medicina tropical e higiene*. 90 (5): 794–9. doi:10.4269/ajtmh.13-0722. PMC 4015566. PMID 24808246.
7. Montoya JG (2002). "Diagnóstico de laboratorio de la infección por *Toxoplasma gondii* y *Toxoplasmosis*". *El Diario de Enfermedades Infecciosas*. 185 Suplemento 1: S73–82. doi:10.1086/338827. PMID 11865443.

