

TOXOPLASMA ELISA IgM CAPTURE

Producto para diagnóstico *in vitro*

M1027: Prueba inmunoenzimática de captura para determinar anticuerpos IgM frente a *Toxoplasma gondii* en suero/plasma humano. 96 tests.

INTRODUCCIÓN:

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado de distribución mundial. Los humanos pueden adquirir la infección por ingestión de ooquistes desde las heces de gato, o por ingestión de carne infectada, o bien por infección intrauterina, transfusión o trasplante de órganos. Aunque la mayor parte de las infecciones son asintomáticas, la enfermedad puede ser grave en inmunodeprimidos o en la infección congénita. En mujeres infectadas durante el primer trimestre del embarazo puede dar lugar a aborto espontáneo o provocar en el feto hidrocefalia. Cuando la enfermedad se adquiere más tarde en el embarazo la afección del feto suele ser menos importante.

Los anticuerpos IgM aparecen a los 5 días después de la infección y caen a niveles bajos o indetectables en semanas o meses en la mayor parte de los enfermos. Los anticuerpos IgG aparecen semanas después de la infección y persisten el resto de la vida.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Método de ELISA basado en la captura de IgM presente en la muestra por anticuerpos anti-IgM unidos a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior el antígeno conjugado con peroxidasa reacciona con las IgM capturadas y el que no se une es eliminado por los lavados; el antígeno unido reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

CARACTERÍSTICAS:

Todos los reactivos a excepción de la solución de lavado y el conjugado vienen listos para su uso.

Las soluciones de dilución de muestras están coloreadas como ayuda a la realización de la técnica.

No se precisa dilución previa de la muestra.

Los pocillos son individuales, por lo que solo se consumen tantos pocillos como pruebas se van a realizar.

CONTENIDO DEL KIT:

- 1 VIRCELL IgM CAPTURE PLATE: 1 placa con 96 pocillos recubiertos con anticuerpo anti-IgM (μ específico).
- 2 VIRCELL SERUM DILUENT: 25 ml de diluyente para sueros: tampón fosfatos con estabilizante de proteínas, con Neolone y Bronidox y coloreado de azul. Listo para su uso.
- 3 VIRCELL IgM POSITIVE CONTROL: 1,5 ml de control positivo con Neolone y Bronidox. Listo para su uso.
- 4 VIRCELL IgM CUT OFF CONTROL: 1,5 ml de cut off con Neolone y Bronidox. Listo para su uso.
- 5 VIRCELL IgM NEGATIVE CONTROL: 1,5 ml de control negativo con Neolone y Bronidox. Listo para su uso.

6 VIRCELL TOXOPLASMA CONJUGATE: 5 viales de antígeno de *T. gondii* marcado con peroxidasa, liofilizado.

7 VIRCELL TMB SUBSTRATE SOLUTION: 15 ml de solución de sustrato: tetrametilbenzidina (TMB). Listo para su uso.

8 VIRCELL STOP REAGENT: 15 ml de solución de parada: ácido sulfúrico 0,5 M.

9 VIRCELL WASH BUFFER: 50 ml de solución de lavado (concentrado 20x): tampón fosfatos con Tween^R-20 y con Proclin 300.

10 VIRCELL TOXOPLASMA RECONSTITUTION SOLUTION: 17 ml de solución tamponada para la reconstitución del conjugado liofilizado. Contiene Neolone y Bronidox.

Conservar entre 2 y 8°C y comprobar la fecha de caducidad.

Material necesario no contenido en el kit:

- Pipeta de precisión para dispensar 5 y 100 μ l.
- Pipeta multicanal de precisión para dispensar 100 μ l.
- Lavador de placas de ELISA.
- Incubador/baño termostatzado.
- Espectrofotómetro de placas de ELISA con filtro de 450 nm y filtro de referencia de 620 nm.
- Agua destilada.
- Alternativamente procesador automático de ELISA.

CONSERVACIÓN:

Conservar entre 2 y 8°C. No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La caducidad indicada será válida siempre que los componentes se mantengan cerrados y conservados entre 2 y 8°C.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES UNA VEZ ABIERTOS:

Componente	Estabilidad
Solución de lavado diluida (1x)	4 meses a 2-8°C
Conjugado reconstituido	1 mes a 2-8°C
Resto de componentes	Fecha indicada en envase a 2-8°C

ESTABILIDAD Y USO DE LOS REACTIVOS:

Usar todos los reactivos en condiciones asépticas para evitar contaminaciones microbianas.

No permitir el secado de la placa entre los lavados y la adición de los reactivos.

La solución de sustrato es fotosensible. Evitar la exposición directa a la luz y desechar si presenta coloración azul. La solución de sustrato no debe entrar en contacto con oxidantes como soluciones de hipoclorito ni con algunos metales. Evitar el contacto con partes metálicas o componentes metálicos de equipos o instrumentos sin antes haber comprobado su compatibilidad.

Utilizar solo la cantidad de solución de lavado, sustrato, diluyente de sueros y conjugado necesarias para la realización de la prueba. No devolver a los viales el exceso sobrante.

VIRCELL, S.L. no se responsabiliza de la inadecuada utilización de los reactivos contenidos en el kit.

RECOMENDACIONES Y PRECAUCIONES:

1. Este producto es solo para diagnóstico *in vitro* y está destinado al uso por personal sanitario cualificado.
2. Usar solo componentes del kit. No mezclar los componentes de diferentes kits o fabricantes. Solo las soluciones de lavado,

sustrato, parada y diluyente de sueros son compatibles con los equivalentes en otras referencias y lotes de ELISA CAPTURA VIRCELL.

3. Utilizar puntas de pipeta diferentes y limpias para cada fase del ensayo. Utilizar solo material limpio y preferentemente desechable.

4. No utilizar en caso de deterioro del envase.

5. No pipetear con la boca.

6. El diluyente para sueros, placa, conjugado, solución de reconstitución y controles de este equipo contienen material de origen animal. Los controles contienen además material de origen humano. Aunque los sueros control del equipo son sometidos a controles de ausencia de HBsAg y anticuerpos frente a VIH y de Hepatitis C, es necesario manejar los controles y muestras del paciente como potencialmente patógenos. El conjugado contiene antígeno inactivado, no obstante, debe manejarse con precaución. Ningún método actual puede asegurar por completo la ausencia de éstos u otros agentes infecciosos. Todo el material debe ser manipulado y desechado como potencialmente infeccioso. Observe la regulación local en materia de residuos clínicos.

7. Evitar el contacto de la solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M) con la piel o los ojos. En caso de contacto, lavar la zona inmediatamente con agua.

8. Proclin 300 está incluido como conservante en la solución de lavado. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. En caso de contacto con la piel lavar con agua y jabón abundantes. Para más información, solicite la hoja de seguridad del producto.

TOMA DE MUESTRA:

La sangre debe extraerse en condiciones asépticas mediante técnicas de venipuntura por personal experimentado. Se recomienda el uso de técnicas asépticas o estériles para evitar la contaminación de la muestra. Los sueros/plasmas deben mantenerse refrigerados entre 2 y 8°C si se van a procesar dentro de los 7 días siguientes a la toma, pero si el procesamiento se va a prolongar deben congelarse a -20°C, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias. No utilizar muestras hiperlipémicas, hemolizadas o contaminadas. Las muestras que presenten partículas pueden ser clarificadas por centrifugación. Pueden utilizarse muestras de suero o plasma indistintamente.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS:

La solución de lavado es necesario prepararla con antelación a la realización de la prueba. Para ello completar hasta 1 litro con agua destilada un vial de 50 ml de solución de lavado concentrada (20x). Si aparecen cristales durante la conservación de la solución concentrada, calentar a 37°C antes de diluirlo. Una vez preparada conservar entre 2 y 8°C.

La solución de conjugado debe ser preparada al menos una hora antes de ser usada. Añadir 3 ml de solución de reconstitución [10] a un vial de conjugado liofilizado [6]. Dejar durante un minuto para permitir la rehidratación y mezclar vigorosamente mediante vortex. El conjugado reconstituido puede ser usado durante un mes si es almacenado entre 2-8°C.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO:

1. Ajustar una estufa/baño de agua a 37±1°C.

2. Sacar todos los reactivos 1 hora antes de la realización del test para que alcancen la temperatura ambiente, evitando sacar la placa del envase.

3. Agitar todos los componentes.

4. Sacar el número de pocillos [4] necesarios para el número de muestras que se van a procesar, más otros cuatro pocillos, uno para el control positivo, uno para el control negativo y dos para el suero cut off. Colocar el resto de los pocillos en el sobre y volver a cerrarlo.

5. Añadir 100 µl de diluyente de muestras [2] a todos los pocillos que se vayan a emplear, excepto a los de los controles. Añadir 5 µl de las muestras, 100 µl del control positivo [3], 100 µl del suero cut off [4] (en duplicado) y 100 µl del control negativo [5] en los pocillos correspondientes.

6. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 60 minutos a 37±1°C.

7. Preparar la solución de conjugado según se indica en "Preparación de los reactivos".

8. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado [9], asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.

9. Añadir inmediatamente 100 µl de conjugado reconstituido (preparado anteriormente) a todos los pocillos.

10. Tapar mediante lámina adhesiva e incubar en estufa/baño durante 60 minutos a 37±1°C.

11. Retirar la lámina adhesiva, aspirar el contenido de todos los pocillos y lavar cada uno de ellos 5 veces con 0,3 ml de solución de lavado [9], asegurándose que no quedan restos de solución de lavado.

12. Añadir inmediatamente 100 µl de solución de sustrato [7] a todos los pocillos.

13. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en la oscuridad.

14. Añadir inmediatamente 50 µl de solución de parada [8] a todos los pocillos.

15. Valorar espectrofotométricamente a 450/620 nm, antes de 1 hora de acabado el ensayo.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO:

Cada lote se somete a control de calidad interno antes de su liberación asegurando el cumplimiento del protocolo de validación por el usuario mediante especificaciones más estrictas. Los resultados de control final de cada lote están disponibles.

La correlación del material de control se asegura mediante ensayos paralelos frente a paneles de sueros de referencia internamente validados.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN POR EL USUARIO:

Cada ensayo debe utilizar control positivo, negativo y cut off. Su utilización permite la validación de la prueba y el equipo.

Las densidades ópticas (D.O.) de los controles deben estar en los rangos siguientes. En caso contrario se desechará la prueba.

Control	D.O.
Control positivo	>0,9
Control negativo	<0,5
Control cut off	>0,55
	<1,5



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Calcular la media de las D.O. del suero cut off.

Índice de anticuerpos=(D.O. de la muestra / media de D.O. del suero cut off) x 10

Índice	Interpretación
<9	Negativo
9-11	Dudoso
>11	Positivo

Las muestras con resultados dudosos deben ser vueltas a analizar y/o solicitar una nueva muestra para confirmación de los resultados.

Las muestras con índices inferiores a 9 se considera que no tienen anticuerpos específicos frente a *T. gondii* de tipo IgM.

Las muestras con índices superiores a 11 se considera que tienen anticuerpos específicos frente a *T. gondii* de tipo IgM.

LIMITACIONES DEL MÉTODO:

- Este método está diseñado para ser utilizado con suero/plasma humano.
- El uso de este kit requiere la cuidadosa lectura y comprensión del folleto de instrucciones. Es necesario seguir estrictamente el protocolo para obtener resultados fiables, en particular el correcto pipeteo de muestras y reactivos, lavados y tiempos de incubación.
- Los resultados de las muestras deben ser valorados junto con la sintomatología clínica y otros procedimientos diagnósticos. El diagnóstico definitivo debe realizarse mediante técnicas de aislamiento.
- El test no indica el lugar de la infección. No pretende sustituir al aislamiento.
- La ausencia de un aumento significativo en el nivel de anticuerpos no excluye la posibilidad de infección.
- Una respuesta IgM puede acompañar algunas veces a una reinfección.
- En ocasiones niveles bajos de IgM podrían persistir durante más de 12 meses post-infección.
- En pacientes inmunosuprimidos una respuesta negativa no excluye la presencia de infección. Se han descrito casos de reactivación de *T. gondii* adquirida en infecciones pasadas en estos pacientes.
- La reactivación de infecciones latentes puede no dar una respuesta de anticuerpos IgM.
- Los resultados de prestaciones incluidos corresponden a estudios comparativos con equipos de referencia comerciales en una muestra poblacional definida. Pueden encontrarse pequeñas variaciones en poblaciones diferentes o con equipos de referencia distintos.

PRESTACIONES:**• SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD:****TEST 1**

Se ensayaron 109 muestras de suero/plasma con TOXOPLASMA ELISA IgM CAPTURE frente a otro kit ELISA comercial. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgM	109	100	97
95% C.I.		92-100	88-99

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

Los resultados discrepantes se resolvieron mediante otro kit ELISA comercial.

TEST 2

Se ensayaron 84 muestras de suero/plasma con TOXOPLASMA ELISA IgM CAPTURE frente a otros kit ELISA comerciales. Se obtuvieron los siguientes resultados frente al consenso:

	Nº muestras	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
IgM	84	98	100
95% C.I.			

C.I. Intervalo de confianza

Los valores indeterminados fueron excluidos de los cálculos finales.

• PRECISIÓN INTRAENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente 10 veces cada uno en un único ensayo realizado por el mismo operador en condiciones de trabajo idénticas, obteniendo los resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	2,39
CN	10	11,82
CO	10	2,88

C.V. Coeficiente de variación

• PRECISIÓN INTERENSAYO:

Se ensayaron 3 sueros pipeteados individualmente durante 5 días consecutivos y por 2 operadores diferentes, obteniendo los siguientes resultados:

Suero	N	% C.V.
CP	10	2,62
CN	10	9,32
CO	10	3,70







C.V. Coeficiente de variación

• REACCIÓN CRUZADA E INTERFERENCIAS:

Se ensayaron 8 muestras caracterizadas positivas frente a otros miembros del grupo sindrómico (virus Epstein-Barr, citomegalovirus (CMV), rubeola) y otros protozoos (Leishmania). Se realizó un ensayo IgM a 2 muestras caracterizadas positivas frente a factor reumatoide.

Las muestras ensayadas dieron resultados negativos, demostrando la reacción específica del ensayo sin reacción cruzada o interferencias ocasionadas por los agentes descritos.

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN EL PRODUCTO:

	Producto para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad
	Conservar entre x-y°C
	Contiene suficiente para <n> pruebas
	Lote
	Referencia (catálogo)
	Consultar instrucciones de uso
	<X> pocillos



BIBLIOGRAFÍA:

1. Del Bono, V., A. Canessa, P. Bruzzi, M. A. Fiorelli, and A. Terragna. 1989. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol* 27:2133-5.
2. Filice, G. A., A. S. Yeager, and J. S. Remington. 1980. Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol* 12:336-42.
3. Fung, J. C., A. Clogston, P. Swenson, and M. Kaplan. 1985. Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M antibodies. *Am J Clin Pathol* 83:196-9.
4. Guerina, N. G., H. W. Hsu, H. C. Meissner, J. H. Maguire, R. Lynfield, B. Stechenberg, I. Abrams, M. S. Pasternack, R. Hoff, R. B. Eaton, and a. l. et. 1994. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional *Toxoplasma* Working Group. *N Engl J Med* 330: 1858-63.
5. Herbrink, P., A. M. van Loon, J. P. Rotmans, F. van Knapen, and W. C. van Dijk. 1987. Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 25:100-5.
6. Jenum, P. A. and B. Stray-Pedersen. 1998. Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J Clin Microbiol* 36:2907-13.
7. Lin, T. M., M. W. Chin-See, S. P. Halbert, and J. M. Joseph. 1986. An enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii* which is not affected by rheumatoid factor or immunoglobulin G antibodies. *J Clin Microbiol* 23:77-82.
8. Naot, Y. and J. S. Remington. 1980. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 142:757-66.
9. Van Loon, A. M., J. T. van der Logt, F. W. Heessen, and J. van der Veen. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect immunofluorescence and double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 17:997-1004.

Para cualquier aclaración o consulta, contactar con:

customerservice@vircell.com

REVISADO: 2018-06-28
L-M1027-ES-01

FOR INFORMATION USE ONLY

