

## **MANUAL DE INSTRUCCIONES:**

**1) NOMBRE DEL PRODUCTO:** IFIFLUOR PARASITEST TOXOPLASMA GONDII

**2) USO A QUE ESTA DESTINADO:**

Equipo por inmunofluorescencia para la determinación de anticuerpos anti Toxoplasma gondii séricos por inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de TOXOPLASMOSIS. Uso in vitro.

**3) NÚMERO DE UNIDADES DE ANÁLISIS:**

El equipo permite 25 - 50 - 100 determinaciones de sueros individuales.

**4) FUNDAMENTO DEL MÉTODO**

La toxoplasmosis es una enfermedad parasitaria que puede infectar a la especie humana. En adultos la forma adquirida es muy leve, pero el peligro reside en la transmisión desde la mujer embarazada al feto. En EEUU nacen anualmente 2000-3000 niños con toxoplasmosis congénita. Los pacientes afectados pueden presentar encefalitis, corioretinitis, calcificación cerebral, neumonía y hepatomegalia y/o esplenomegalia. La enfermedad congénita puede tomar una forma de acción retardada con enquistamiento en los ojos y sistema nervioso por muchos años.

La toxoplasmosis se transmite al hombre de dos maneras distintas. La primera es comiendo carne infectada, no suficientemente cocida, y la segunda es a través de un gato infectado (más común). El parásito cumple su ciclo reproductivo en el intestino del gato y los quistes se eliminan por las heces. El quiste puede ser también inhalado.

En 1962 Kelen adoptó la técnica de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la toxoplasmosis. Se encontró que esta técnica tiene mayor sensibilidad que la fijación del complemento y es más segura y simple que el Dye Test (Sabin Feldman). La IFI iguala al Dye Test en sensibilidad y especificidad eliminando la necesidad de trabajar con animales vivos. Según Flecher, las ventajas de la IFI residen en su facilidad de estandarización y en la simplicidad del método.

Para distinguir la infección aguda, que presenta niveles importantes de IgM, se recomienda absorber el suero con un absorbente de IgG apropiado, para evitar falsos positivos en pacientes con factores reumatoideos o anticuerpos anti-núcleo (FAN).

El equipo IFIFLUOR PARASITEST TOXOPLASMOSIS emplea la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos séricos anti-toxoplasma. El suero del paciente en una dilución adecuada, se enfrenta con las improntas que contienen el parásito. Los anticuerpos específicos, si están presentes, se unen al sustrato antigénico. Luego de lavar para eliminar los componentes no unidos, los anticuerpos unidos reaccionan con la antigamma globulina marcada con FITC. Un segundo lavado elimina los elementos no unidos. Finalmente, luego de montados y cubiertos con cubreobjetos, se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia.

**5) RESUMEN Y EXPLICACION DEL ENSAYO**

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LAS MUESTRAS: Para TOXOPLASMOSIS: Se debe inactivar el suero por 30 min a 56°C y luego efectuar una dilución 1/32. Por ejemplo 0,1ml de suero en 3,1ml de buffer BFS. De ser necesario titular, hacer las diluciones con buffer BFS. **NO DILUIR LOS CONTROLES DEL EQUIPO, SON LISTOS PARA USAR**

3. PREPARACION DE LAS IMPRONTAS DE PARASITOS:

A) Retirar los portaobjetos del envase, dejar secar a temperatura ambiente.

B) Sembrar los sueros controles positivos, negativos y muestras a procesar. Tener la precaución de no tocar con la pipeta las áreas reactivas, dejando caer suavemente la gota de la dilución sobre el área reaccionante.

4. INCUBACION: Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), en una cámara húmeda tapada para evitar la evaporación de las muestras.

5. LAVADO: Sacar los portaobjetos y lavarlos con abundante BFS derramando con una pipeta el líquido directamente sobre cada área para evitar la contaminación entre las mismas. Sumergir los portaobjetos 5 minutos en BFS en un frasco tipo Coplin agitando suavemente. Retirar el BFS del Coplin y reemplazarlo por BFS limpio dejando en reposo por 5 minutos más. El lavado puede prolongarse más tiempo sin afectar los resultados.

6. INCUBACION CON ANTIGAMMA GLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCENCIA. (diluirla previamente con BFS según rótulo). Sacar los portaobjetos del BFS. Secar con papel de filtro entre las áreas y cubrirlas con la ANTIGAMMA. Incubar a temperatura ambiente 20 minutos. La cámara húmeda debe estar tapada para evitar la evaporación de la antigama.

7. LAVADO: Repetir paso 5.

8. Cubrir las áreas reactivas con la solución de Azul de Evans durante 2 minutos, lavar con BFS y secar suavemente con papel de filtro alrededor de las áreas reactivas.

9. MONTAJE: Sacudir suavemente los portaobjetos sobre papel de filtro. Secar entre las áreas con papel de filtro, cuidando de no tocar las áreas reactivas. Montar con cubreobjetos escrupulosamente limpios y con una gota de medio de montaje. Cubrir los portaobjetos suavemente evitando la formación de burbujas que dificultan la lectura.

10. LECTURA: Leer en lo posible dentro de las primeras horas. Se pueden conservar en heladera 2-8°C por algunos días sellando los bordes del cubreobjeto con esmalte de uñas.

#### **6) INSTRUCCIONES PARA SU CONSERVACION:**

Inmediatamente de recibir el equipo guardar las improntas en freezer a -20°C y el resto del equipo en heladera de 2-8°C.

#### **7) FORMA DE PRESENTACION:**

Equipos de 25, 50 y 100 determinaciones.

#### **8) COMPOSICION, DESCRIPCION CUALI-CUANTITATIVA DE LOS COMPONENTES. INDICACIONES ACERCA DE LA PREPARACION DE LOS COMPONENTES EN CASO DE NO SER LISTOS PARA USO**

##### MATERIALES PROVISTOS

Según sean 25, 50 o 100 determinaciones:	25 det.	50 det.	100 det
Portaobjetos de 7 áreas reactivas (4 det + 2 controles)	5	10	20*
Antigamma globulina humana marcada con FITC	0.10 ml	0.20 ml	0.30 ml
Sobre de buffer fosfato salino pH 7,2 ± 0.2 para reconstituir a 1 litro	1	2	3
Suero humano control positivo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Suero humano control negativo listo para usar	1.00 ml	1.00 ml	1.00 ml
Medio de montaje	3 ml	5 ml	5 ml
Cubreobjetos (opcional)	5	10	20
Instrucciones de uso	1	1	1

\*Los equipos de 100 det. pueden incluir 10 portaobjetos de 12 áreas (10 det + 2 controles) en lugar de los portaobjetos de 7 áreas. Esos equipos contienen 0.20 ml de antigamma y 10 cubreobjetos.

##### PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

1. RECONSTITUCION DEL BUFFER FOSFATO SALINO (BFS) Disolver el sobre del buffer en 1 litro de agua destilada. Conservar en la heladera hasta 4 semanas.

2. DILUCION DE LA ANTI-GAMMA GLOBULINA HUMANA: Diluir el volumen a utilizar en BFS de acuerdo a la dilución recomendada en el rótulo del frasco.

##### MATERIALES REQUERIDOS, NO PROVISTOS

- Agua destilada para reconstituir el buffer BFS
- Tubos de ensayo para realizar las diluciones de las muestras y la antigamma
- Pipetas de 5 ml y pipetas automáticas
- Cámara húmeda o placas de Petri con papel humedecido
- Frascos tipo Coplin
- Cronómetro
- Microscopio de fluorescencia

### **9) MUESTRAS A EMPLEAR . CONDICIONES DE OBTENCION DE LA MISMA.**

El ensayo utiliza muestras de suero humano obtenidas luego de la coagulación de la sangre proveniente de punción venosa. Se debe emplear suero inactivado durante 30 min. a 56°C, no usar muestras lipémicas, hemolizadas o contaminadas. Si no se procesan inmediatamente los sueros, se pueden conservar congelados a -20°C por un tiempo prolongado. PRECAUCION: Evitar los ciclos de congelamiento-descongelamiento de las muestras.

### **10) CALCULO DE RESULTADOS, UNIDADES DE EXPRESION, ORIGEN DE LOS PATRONES UTILIZADOS O DE SU EQUIVALENCIA EN ESTANDARES INTERNACIONALES**

Los resultados se expresan como positivos (fluorescencia verde manzana) o negativos (no fluorescentes). Para toxoplasmosis se titula utilizando con diluciones de suero progresivas, teniendo significado clínico las muestras con títulos mayores a 1/256.

Los toxoplasmas se observan nítidos con fluorescencia alrededor del parásito. La titulación se realiza hasta que desaparece la fluorescencia en los parásitos. El título es la mayor dilución a la cual se observa la fluorescencia.

En el control negativo se observa levemente la coloración del Azul de Evans que da un suave tono rojizo.

### **11) INTERVALO DE NORMALIDAD O INTERVALO TERAPEUTICO:**

El ensayo resulta negativo en los sueros de los pacientes que no han tenido contacto con el T. gondii.

### **12) DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DEL SISTEMA: SENSIBILIDAD, PRECISION, EXACTITUD, ESPECIFICIDAD, POTENCIA, ESTABILIDAD.**

**Sensibilidad:** La técnica de inmunofluorescencia indirecta esta considerada de extrema sensibilidad y precisión desde los trabajos originales de Coons.

Existe una buena correlación entre los métodos de aglutinación y la IFI. Walton estudió más de 1000 sueros encontrando buena correlación entre la IFI y la técnica de Sabin Feldman, aunque con cierta tendencia de la IFI a títulos más altos. Esta prueba iguala a la técnica de referencia Sabin Feldman (Dye test), pero presenta una mayor simplicidad y facilidad de estandarización e interpretación.

**Precisión:** Se han realizado repeticiones del ensayo para una serie de 10 sueros positivos, de diferentes títulos, incluyendo positivos débiles y fuertes. En ningún caso los resultados difirieron en más de un título, tanto intraensayo como interensayo.

**Especificidad:** Se han testeado sueros positivos para diferentes patologías autoinmunes y parasitarias, obteniéndose en todos los casos resultados negativos.

La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

**Estabilidad:** Conservando el equipo en las condiciones especificadas, el material no sufre deterioro dentro del plazo de actividad fijado. La anti-gamma diluída no debe reutilizarse y debe ser preparada fresca en cada ensayo. El buffer BFS es estable durante 4 semanas a 2-8°C. Se recomienda filtrar el buffer una vez reconstituido.

### **13) PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE SU USO. LIMITACIONES DEL METODO, SUSTANCIAS INTERFERENTES, ETC.**

#### **PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS:**

-Los componentes de suero humano utilizados en la preparación de los controles de este equipo han sido encontrados no reactivos para la presencia de antígeno de superficie de Hepatitis B (HBsAg), anticuerpos anti-virus de inmunodeficiencia humana I y II (HIV-I+II) y Hepatitis C. Dado que ningún test diagnóstico puede ofrecer una seguridad absoluta acerca de la ausencia de los virus HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos basados en productos humanos deben ser tratados como potencialmente infecciosos.

-No usar los reactivos contenidos en el equipo después de la fecha de vencimiento impresa en el equipo.

-Todas las incubaciones deben realizarse en cámara húmeda o en una placa de Petri que contenga papel de filtro humedecido para evitar la evaporación de los reactivos.

-Se deben mantener húmedas las áreas reactivas durante toda la técnica (evitar cualquier técnica de secado artificial como: secado al aire, con estufa y/o secadores). Después de los pasos de lavado, se recomienda remover el exceso de humedad con papel absorbente; secar los bordes laterales externos del portaobjetos y secar con cuidado entre las áreas, sin tocar las áreas reactivas.

-Algunos de los componentes de este equipo contienen azida de sodio como conservante. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías, formando azidas metálicas explosivas. Cuando se descarten los reactivos, dejar fluir abundante agua para evitar la formación de estos compuestos.

-Nunca pipetear con la boca o permitir que muestras de pacientes entren en contacto con la piel.

-Todos los materiales usados en este ensayo, incluyendo los reactivos, muestras y materiales para limpieza deben ser descartados de manera de inactivar los agentes infecciosos. Se recomienda utilizar en la descontaminación, hipoclorito de sodio al 1%, durante un tiempo igual o mayor a 30 minutos.

-La técnica ha sido estandarizada para una temperatura ambiente media (18-25°C), desvíos importantes de esa temperatura pueden producir resultados inconsistentes.

-Sólo para uso diagnóstico in vitro.

#### LIMITACIONES

-El usuario del equipo debe leer cuidadosamente el inserto. El cumplimiento estricto del protocolo es indispensable para obtener resultados confiables. Ante cualquier duda comunicarse con nuestro Servicio de Asesoría Técnica.

-El exceso de lípidos en el suero a testear produce una reacción "filming" (película que encubre la reacción específica). No confundir con reacción positiva.

-La intensidad de la fluorescencia, así como el punto final de la titulación es afectada por el equipamiento utilizado (desgaste de la lámpara, óptica del microscopio, etc.). Consulte a nuestro Laboratorio por los controles titulables que permiten verificar y estandarizar los resultados de fluorescencia.

#### **14) BIBLIOGRAFIA:**

- COONS AH, CREECH HJ, JONES RM, THE DEMONSTRATION OF NEUMOCOCCAL ANTIGEN IN LISSIES BY THE USE OF FLUORESCENT ANTIBODY. J. IMMUNOL 1942, 45:159-170

- SABIN AB, FELDMAN HA, REYES AS, A MICROCHEMICAL INDICATORS OF A NEW INMUNITY PHENOMENON AFFECTING A PROTOZOAN PARASITE (TOXOPLASMA) SCIENCE 1948,108: 660-663.

- SEGUELA JP, BESSIERES MH, FASSE C, LAUNAI B, POZRT S, RECCO P, APLICACION DE LA REACTION D' HEMOAGLUTINACION INDIRECTE AU SERO - DIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE. MED ET MAL. INFECT 1976, 6: 268 – 274.

-FULTON JD, TURK JL, DIRECT AGGLUTINATION TEST FOR DIAGNOSIS OF TOXOPLASMA INFECTION. MELLIOD FOR INCREASING SENSITIVITY AND SPECIFICITY. J. CLIN. MURDEIOL. 1980, 11: 562-568.

-KOLLIMAN RF, THE DIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS SERODIAG. IMMUNOTHER. INFECT. DIS. 1990, 4: 83-93.

-GOLDMAN M, STAINING TOXOPLASMA GONDII WITH FLUORESCEIN LABELLED ANTIBODY II. A NEW SERODIAGNOSTIC TEST. J. EXP. MED. 1957, 105: 549-573.

-KELEN AE, AYLLON SEINDL L, LABZOFFSKI NA, INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY METHOD IN SERODIAGNOSIS OF TOXOPLASMOSIS. CAN. J. MICROBIOL. 1962, 8: 545-554.

#### **15) ESTABLECIMIENTO IMPORTADOR Y/O ELABORADOR. NOMBRE DEL DIRECTOR TECNICO, DOMICILIO LEGAL Y EN CASO DE PRODUCTOS IMPORTADOS TOTALMENTE TERMINADOS O FRACCIONADOS DEBERA CONSTAR EL ORIGEN DE ELABORACION (NOMBRE DE LA FIRMA Y DIRECCION)**

Establecimiento elaborador: LABORATORIO IFI

Directora Técnica: Bioq. Liliana Roquel

Domicilio Legal: Chile 523 (1603) Villa Martelli - Buenos Aires

#### **16) LEYENDA "PRODUCTO DE DIAGNOSTICO AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL, NUMERO"**

Producto de diagnóstico autorizado por el Ministerio de Salud y Acción Social Nro.1760