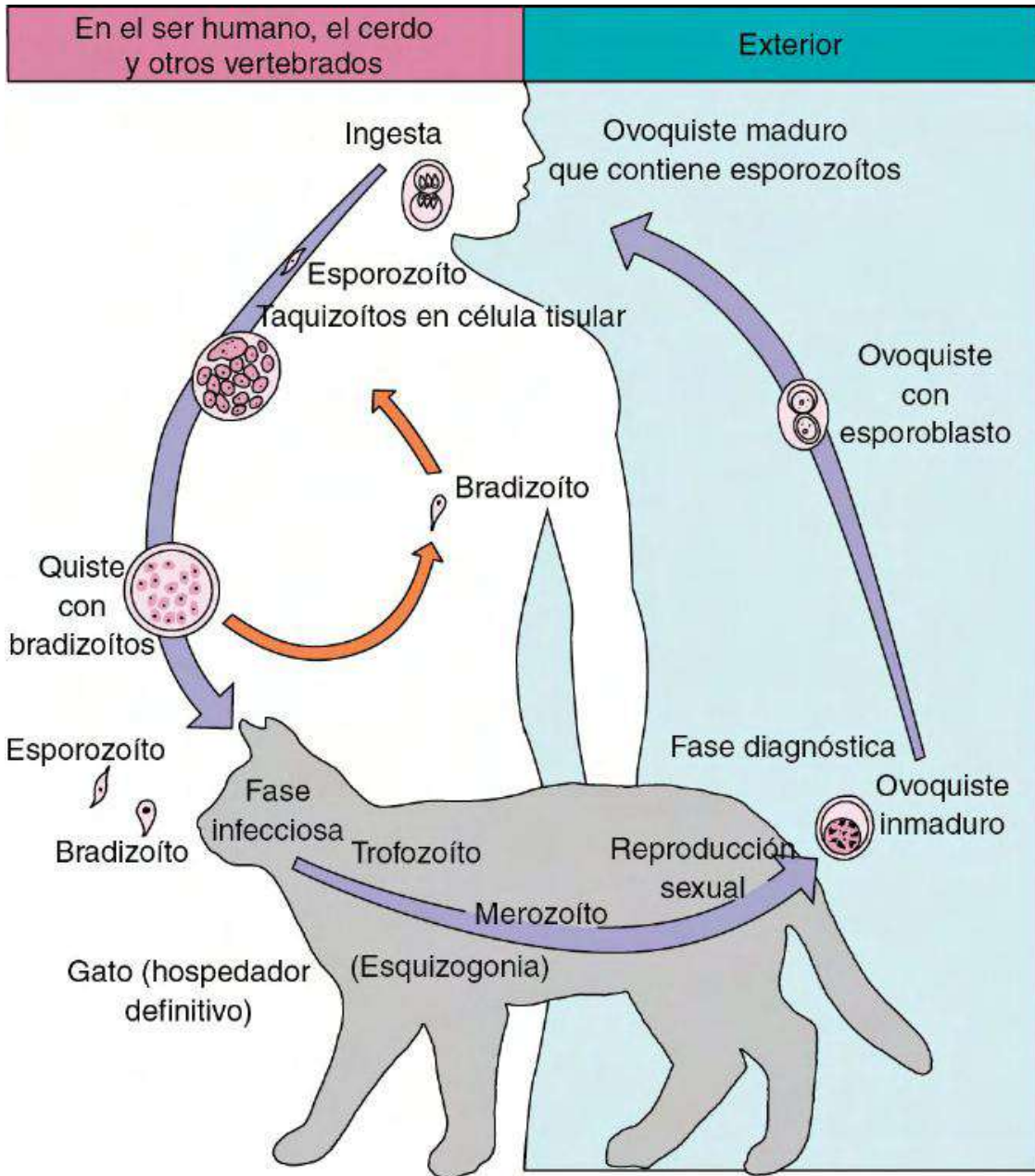


# **ANEXOS**

# ANEXO 1

## CICLO BIOLÓGICO DEL PARASITO



**ANEXO 2**

**TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA**







## ANEXO 5

### PROSPECTO HAI TOXO

*Manual de Instrucciones*

#### **HAI TOXO POLYCHACO**

PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS  
CONTRA EL TOXOPLASMA GONDII

Uso "In Vitro"

480 determinaciones de un título o 96 determinaciones de cinco títulos

#### **APLICACION**

HAI TOXO POLYCHACO puede ser utilizado como auxiliar en el diagnóstico de casos presuntivos de Toxoplasmosis o para ensayos epidemiológicos.

#### **FUNDAMENTO DEL METODO**

Los anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii*, presumiblemente presentes en el suero humano o de animales en estudio, aglutinan al antígeno fijado sobre la superficie de los hematíes de carnero estabilizados, los cuales sedimentan formando un manto en el fondo del pocillo de la policubeta.

En los sueros de muchas personas no parasitadas se encuentran globulinas capaces de aglutinar inespecíficamente partículas antigénicas de diferente origen, incluyendo hematíes sensibilizados o no. Estas globulinas, a las que pertenecen, entre otras, los anticuerpos inespecíficos o heterófilos, la Proteína C Reactiva, etc., están presentes con títulos bajos en una proporción significativa de la población, pudiendo aumentar durante el embarazo y en numerosos procesos infecciosos o inflamatorios.

La heterofilia es detectada estudiando cada suero en la dilución  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$  con hematíes no sensibilizados.

Con el uso de adsorbentes especiales en el Diluyente de Muestras la heterofilia es poco frecuente, pero en caso de observarse puede repetirse el suero tratándolo con 2-ME (2- Mercaptoetanol), solicitando dicho reactivo a nuestro laboratorio. Este agente reductor elimina la capacidad aglutinante de los anticuerpos heterófilos.

#### **REACTIVOS Y MATERIALES PROVISTOS**

- Frasco Nº 1: **Antígeno.** 12 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero sensibilizados con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Agitar intensamente antes de usar.
- Frasco Nº 2: **Diluyente de Muestras.** 30 ml de solución salina isotónica con adsorbentes y conservadores.
- Frasco Nº 3: **Solución Proteica.** 1,5 ml de solución proteica estabilizada, con conservadores.
- Frasco Nº 4: **Hematíes No Sensibilizados.** 5 ml de suspensión estabilizada de hematíes de carnero no sensibilizados. Para control de heterofilia. Agitar intensamente antes de usar.
- Frasco Nº 5: **Control Positivo.** 0,5 ml de una dilución de suero reactivo para anticuerpos contra *T.gondii*, titulado, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.
- Frasco Nº 6: **Control Negativo.** 0,5 ml de una dilución de suero no reactivo para anticuerpos contra *T. gondii*, inactivado, con conservadores. Material potencialmente infeccioso. Listo para usar.

5 Policubetas descartables, cada una con 96 pocillos con fondo en "U".



## REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

- \* Microgoteros de 25  $\mu$ l
- \* Micropipetas o microdiluidores de 25  $\mu$ l
- \* Pipetas de 5 y 1 ml
- \* Espejo para lectura de policubetas o fondo blanco
- \* Papel de filtro
- \* Agua destilada o agua desionizada
- \* Solución fisiológica de uso alternativo para el tratamiento con 2-ME

## ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha que figura en la caja y frascos. Guardar los componentes del equipo preferentemente entre 2 y 8 °C, siempre en posición vertical. **No congelar.**

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico "In Vitro".
- Las muestras de sueros humanos y los controles deben ser considerados como potenciales portadores de agentes infecciosos, por lo que se recomienda respetar las condiciones de bioseguridad en su manipulación.
- Todo material utilizado en la reacción debe ser considerado contaminado, debiendo ser inactivado con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 minutos, ó autoclavado durante por lo menos 1 hora a 121,5°C.
- Defectos en el volumen de dispensado del Control Positivo ocasionados por su viscosidad, puede dar títulos diferentes al declarado. Por eso es necesario extremar las precauciones en su manipulación.
- No utilizar el equipo después de la fecha de vencimiento.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- Verificar que el volumen de las micropipetas o microdiluidores sea el correcto.
- **No congelar el equipo**, pues los glóbulos se autoaglutinan (formación de partículas sólidas macroscópicas). Si esto ocurre, debe descartarlo.
- Si el suero fue tratado con 2-ME verificar que el mismo no se encuentre gelificado, finalizada la incubación post tratamiento. Si gelifica, tratarlo nuevamente realizando una dilución previa 1/2 con solución fisiológica.  
Sueros hiperlipémicos gelifican con más facilidad en el tratamiento con 2-ME.

## PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Antígeno** (frasco N° 1): agitar enérgicamente el frasco antes de usar, hasta obtener una suspensión homogénea. Mantener el frasco en posición vertical.

**Diluyente de Muestras** (frasco N° 2): antes de utilizar el Diluyente, agregar 0,5 ml de Solución Proteica (frasco N° 3), cada 10 ml de Diluyente. Preparar la cantidad necesaria para el uso inmediato, ya que solo es estable durante dos días si se mantiene entre 2 y 8 °C.

**Hematíes No Sensibilizados** (frasco N° 4): agitar enérgicamente el frasco antes de usar, hasta obtener una suspensión homogénea. Mantener el frasco en posición vertical.

**Control Positivo y Negativo** (frascos N° 5 y 6): listos para usar. Estos controles se preparan a partir de suero humano no reactivo para HBsAg y para anticuerpos contra HCV y HIV, adecuadamente inactivado. Sin embargo, todos los derivados de la sangre humana deben manejarse con precaución.

## OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Emplear suero fresco y límpido. La sangre se extraerá de un paciente preferentemente en ayunas siguiendo las normas generales, recogiéndola en tubos de centrifuga. Para obtener el suero dejar coagular la sangre, centrifugar y separar el sobrenadante.

Los sueros pueden ser conservados entre 2 y 8 °C hasta 48 horas, o congelados a -20 °C para un almacenamiento prolongado.

Deben evitarse los congelamientos/descongelamientos repetidos.

## PROCEDIMIENTO

- Colocar 25  $\mu$ l de Diluyente de Muestras (ver preparación de reactivos) utilizando un microgotero o una micropipeta calibrada, a partir del primer pocillo de una policubeta descartable. Utilizar la cantidad de pocillos necesarios hasta la dilución (título) de las muestras y controles que desea investigar.
- Tomar un microdiluidor de 25  $\mu$ l y sumergirlo en un recipiente con agua destilada, secarlo con papel de filtro por rotación y seguidamente colocarlo en el suero a analizar. Al retirarlo controlar que la muestra cubra la totalidad de los espacios libres.
- Sumergir el microdiluidor cargado en el 1º pocillo y girar el mismo entre ambas manos no menos de 10 veces. Esta operación asegurará una perfecta homogeneización de la muestra.
- Transferir los diluidores a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada.
- Retirar los microdiluidores y secarlos con papel de filtro. Sumergirlos sucesivamente en dos recipientes con agua destilada y secarlos con papel de filtro para usarlos nuevamente.
- Repetir los pasos 2 a 5 con el Control Positivo (ver Precauciones y Advertencias) y el Control Negativo provistos en el equipo.  
Si utiliza una micropipeta automática de 25  $\mu$ l para la toma y dilución de la muestra y los controles, homogeneizar por carga y descarga, transfiriendo 25  $\mu$ l de pocillo en pocillo hasta la dilución deseada, descartando los últimos 25  $\mu$ l.
- Depositar 25  $\mu$ l de Hematíes No Sensibilizados (frasco Nº 4) (ver preparación de reactivos) en los pocillos 1, 2 y 3 (dilución  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{1}{8}$ ) solamente del suero. No colocar en las diluciones de los Controles Positivo y Negativo.
- Depositar 25  $\mu$ l de Antígeno (frasco Nº 1) (ver preparación de reactivos) en los restantes pocillos. (Dilución  $\frac{1}{16}$  hasta la dilución a investigar).
- Agitar la policubeta golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales, durante no menos de 30 segundos.
- Dejar la policubeta en reposo a resguardo de vibraciones durante un mínimo de dos horas y leer.

### Esquema del procedimiento

Diluyente de Muestras (0,5 ml de Solución Proteica por cada 10 ml de Diluyente de Muestras).	25 $\mu$ l desde los pocillos 1 hasta los pocillos con la dilución que desea investigar.
Suero, Control Positivo y Control Negativo.	25 $\mu$ l en los pocillos 1
Homogeneizar y transferir 25 $\mu$ l desde el primer pocillo hasta el pocillo con la dilución que desea investigar, despreciando los últimos 25 $\mu$ l.	
Hematíes No Sensibilizados	25 $\mu$ l en los pocillos 1, 2 y 3 del SUERO solamente. No colocar en los Controles Positivo y Negativo.
Antígeno	25 $\mu$ l a partir de los pocillos 4 en adelante.
Agitar manualmente la policubeta durante 30 segundos	
Dejar la policubeta en reposo 2 horas y leer	

### Tabla de dilución

Pocillo	Dilución	Título
1	$\frac{1}{2}$	2
2	$\frac{1}{4}$	4
3	$\frac{1}{8}$	8
4	$\frac{1}{16}$	16
etc.	etc.	etc.



### Procedimiento con 2-Mercaptoetanol

Si fuera necesario tratar los sueros con 2-ME proceder de la siguiente manera:

1. Preparar una solución de 2-ME  $1/100$  en solución fisiológica. Utilizar esta solución solamente el día de su preparación.
2. En un recipiente adecuado colocar iguales volúmenes de suero y de 2-ME  $1/100$  preparado anteriormente. Tapar el recipiente.
3. Incubar durante 30 minutos a 37 °C ó 120 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C). Verificar ausencia de gelificación post incubación. (Ver precauciones y advertencias).
4. Titular según el procedimiento habitual, teniendo en cuenta que en este caso el pocillo 1 corresponde a la dilución  $1/4$ . (Título 4).

### LECTURA

Luego de transcurridas dos horas, proceder a la lectura en espejo para policubetas o sobre un fondo blanco.

REACCIÓN POSITIVA: formación de un manto en el fondo del pocillo por aglutinación del antígeno, que debe ocupar más del 50% del mismo.

REACCIÓN NEGATIVA: formación de un botón nítido o botón con centro de luz, de bordes regulares, por sedimentación del antígeno.

### CRITERIO DE ACEPTABILIDAD DEL ENSAYO

La inclusión de un Control Positivo y Negativo permite verificar la reproductibilidad del ensayo, la estabilidad de los reactivos y llamar la atención sobre posibles errores de técnica.

**El título del Control Positivo se indica en su correspondiente etiqueta y no debe variar más de un orden de dilución (  $\pm 1$  título) durante todo el periodo de vigencia del equipo.** (Ver precauciones y advertencias).

El Control Negativo debe dar reacción negativa durante todo el periodo de vigencia del equipo.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El **título del suero** será la inversa de la dilución que da lugar a un manto que ocupe 50% o más del pocillo.

Muestras cuyos títulos son iguales o mayores que 16, serían reactivas para anticuerpos contra el *Toxoplasma gondii* y por lo tanto presumiblemente pertenecientes a pacientes parasitados.

Aproximadamente 40-50% de la población adulta normal presenta anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.

Muestras cuyos títulos son menores que 16 serían no reactivas para anticuerpos contra el *Toxoplasma gondii* y por lo tanto presumiblemente pertenecientes a pacientes no parasitados.

Una determinación aislada de anticuerpos contra *T.gondii* es poco significativa, por eso es importante estudiar una nueva muestra cada 4 semanas que permita evidenciar variaciones en el título, especialmente en los siguientes casos:

- Reacción Negativa en mujeres durante el periodo de gestación para evidenciar una posible primoinfección, que podría inducir malformaciones congénitas en el feto.
- Reacción Positiva con título tan alto como 2048 que puede evidenciar presumiblemente una infección activa o pertenecer a pacientes crónicos asintomáticos.
- Reacción Negativa o Positiva en pacientes inmunosuprimidos para evidenciar una posible primoinfección o una reactivación de la infección.

En estos casos deberá conservar alícuotas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  tomadas cada 4 semanas y procesarlas simultáneamente utilizando los mismos reactivos y el mismo operador.

Una variación de título en 3 o más diluciones entre las muestras tomadas cada 4 semanas indicaría presumiblemente una primoinfección o una reactivación. Por el contrario, si no se observan variaciones en el título indicaría infección crónica asintomática o ausencia de infección.

#### **Utilidad de los Hematíes No Sensibilizados**

Si hay Reacción Negativa en dilución  $1/8$  implicaría ausencia de anticuerpos heterófilos contra los hematíes de carnero.

Si hay Reacción Positiva en dilución  $1/8$  implicaría presencia de anticuerpos heterófilos contra los hematíes de carnero que podría interpretarse de dos maneras:

- a) Si hay reacción negativa en la dilución  $1/16$  (con el antígeno) significaría que el suero es NO REACTIVO para anticuerpos anti *T. gondii*.
- b) Si hay reacción positiva a la dilución  $1/16$  (con el antígeno) significaría que la reactividad del suero podría ser específica o provocada por los anticuerpos heterófilos. Esta situación es poco frecuente debido a la presencia de adsorbentes de inespecificidad en el Diluyente de Muestras, pero en caso de observarse proceda a repetir el suero tratándolo con 2-ME.

#### **Interpretación de los resultados con 2-ME**

Sueros con títulos mayores o iguales a 8, se considerarían presumiblemente reactivos para anticuerpos anti *T. gondii*.

Títulos menores que 8 serían presumiblemente no reactivos para anticuerpos anti *T. gondii*.

#### **SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD**

En estudios poblacionales con HAI TOXO POLYCHACO, la sensibilidad resultó del 99% considerando como título de corte 16. La especificidad de la reacción con ese título resultó superior al 98%.

Cuando los sueros son tratados con 2-ME la especificidad de la prueba a título 8 es del 100% con una sensibilidad superior al 99%.

#### **LIMITACIONES DEL MÉTODO**

La serología sólo constituye un dato auxiliar para el diagnóstico. HAI TOXO POLYCHACO, como cualquier otra técnica serológica, no puede ser concebida como un método de diagnóstico definitivo ya que éste debe basarse en la correlación de los resultados de más de un test con los datos clínicos. En ese sentido, todo título debe ser interpretado como una probabilidad mayor o menor de acierto en relación al caso estudiado, dentro de la población normal o parasitada.

En infecciones muy recientes ( menos de 10/20 días de evolución ) la hemaglutinación puede presentar resultados negativos o títulos muy bajos.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Wynne de Martini, G.J. y Martín, A.M.: Prueba de hemoaglutinación para Toxoplasmosis en distintos sueros animales. *Rev.Med.Vet.* (Buenos Aires) 58(5-6):437-439 (1977).
2. Thorburn, H.; Williams, H.: A stable haemagglutinating antigen for detecting toxoplasma antibodies. *J. Clin. Path.* 25:762-767 (1972).
3. Lunde, M.N.; Jacobs, L.: Differences in Toxoplasma dye test and hemagglutination antibodies shown by antigen fractionation: *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16(1):26-30 (1967).
4. Jennis, F.: A simplified haemagglutination test for toxoplasmosis using pyruvic aldehyde treated cells. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 44:317-322 (1966).
5. Jacobs, L.; Lunde, M.N.: A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.* 43:308-314 (1957).
6. Stavitsky, A.B.: Micromethods for the Study of Proteins and Antibodies. *J. Immun.* 72: 360-367 (1954).
7. Boyden, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* 93: 107-120 (1951).
8. Middlebrook, G.; Dubos, R.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 88: 521-528 (1948).

## ANEXO 6

### LAVADO DE MANOS



Mójese las manos.



Aplique suficiente jabón para cubrir todas las superficies de las manos.



Frótese las palmas de las manos entre sí.



Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos, y viceversa.



Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados.



Frótese el dorso de los dedos de una mano contra la palma de la mano opuesta, manteniendo unidos los dedos.



Rodeando el pulgar izquierdo con la palma de la mano derecha, fróteselo con un movimiento de rotación, y viceversa.



Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación, y viceversa.



Enjuáguese las manos.



Séqueuelas con una toalla de un solo uso.



Utilice la toalla para cerrar el grifo.



Sus manos son seguras.



## ANEXO 7

### CENTRO DE SALUD CLÍNICA CÍES

