



ENZY-WELL

TOXOPLASMA IgM

REF 91041 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Hersteller:
 Κατασκευάζεται από/ Fabricado por/ Fabriqué par:
 DIESSE Diagnostica Senese S.p.A.
 Strada dei Laghi 39
 53035 Monteriggioni (Siena) – Italy

	Capitolo Section Capítulo
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Eingeführte Änderungen in der vorliegenden Fassung Τροποποιήσεις που εισήχθησαν στην τρέχουσα διόρθωση Cambios introducidos en la revisión actual Modifications apportées à la révision courante Alterações introduzidas na revisão atual	10-15



INDICE / INDEX / INHALT/ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE /CONTEÚDO

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / VERWENDUNGSZWECK/ ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ / INDICACIONES DE USO/ UTILISATION/UTILIZAÇÃO PRETENDIDA
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / PHYSIOLOGIE/ ΕΙΣΑΓΩΓΗ / RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST / INTERET CLINIQUE / SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / TESTPRINZIP/ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ / PRINCIPIO DEL MÉTODO / PRINCIPE/ PRINCÍPIOS DO TESTE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN / ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ / COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO / CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS / CONTEÚDA DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE /
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN / ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΩΝ/ CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS / MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS / ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN/ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ / PRECAUCIONES DE USO / PRECAUTIONS D'UTILISATION / PRECAUÇÕES
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / ART UND LAGERUNG DER PROBEN / ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ / TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION / TYPE D'ECHANTILLON ET CONSERVATION / TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / TESTDURCHFÜHRUNG / ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / PROCEDIMIENTO DEL TEST / PROCEDURE / PROCEDIMENTO DE TESTE /
9. SCHEMA DEL SAGGIO / SCHEME OF TEST PROCEDURE / TESTSCHEMA /ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ/ ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST / SCHEMA D'ANALYSE/ ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE /
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / TESTVALIDIERUNG / ΕΓΚΥΠΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ / VALIDACIÓN DEL TEST / VALIDATION DU TEST / VALIDAÇÃO DO TESTE /
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DER ERGEBNISSE / ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ / INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS / INTERPRETATION DU TEST / INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA / LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / GRENZEN DES VERFAHRENS / ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ / LIMITACIONES DEL TEST / LIMITES DU TEST/ LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO /
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / ANALYTISCHE SPEZIFITÄT /ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ/ ESPECIFICIDAD ANALÍTICA / SPECIFICITE ANALYTIQUE / ESPECIFICIDADE ANALÍTICA /
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT /ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ / SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNOSTICAS / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES / ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO
15. PRECISIONE / PRECISION / PRÄZISION / ΑΚΡΙΒΕΙΑ / PRECISIÓN / PRECISION / PRECISÃO
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / “TROUBLE SHOOTING” / “TROUBLE SHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN) /ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ /GUIA DE RESOLUCION DE PROBLEMAS / RESOLUTION DES PROBLEMES / RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / LITERATUR / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE / REFERÊNCIAS



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI TOXOPLASMA GONDII NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA TOXOPLASMA.

2. INTRODUZIONE

Il *Toxoplasma gondii* è un protozoo ubiquitario capace di infettare tutte le specie di mammiferi. Nell'uomo studi sierologici indicano che una alta percentuale della popolazione adulta è stata infettata da questo parassita. La malattia è particolarmente seria in pazienti immunodepressi durante la gravidanza in quanto viene trasmessa dalla madre al feto. Per quest'ultimo motivo è importante conoscere il titolo anticorpale prima dell'inizio della gravidanza e nei soggetti non immuni controllare con frequenti analisi se si verifica sieroconversione. La diagnosi sierologica di Toxoplasmosi può essere effettuata dosando le IgM specifiche in quanto questi anticorpi abbinati ai sintomi clinici hanno un considerevole significato diagnostico.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti *Toxoplasma* si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline e successiva rivelazione di quelle specifiche sfruttando la loro capacità di legare un antigene coniugato a perossidasi. La cattura si effettua con anticorpi monoclonali legati alla fase solida (pozzetti di microtiter). L'antigene è costituito da tachizoiti purificati, inattivati e sonicati marcati con perossidasi legata a monoclonali specifici anti *Toxoplasma*.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12x8 pozzetti sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (M seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1x1.6 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT-OFF CONTROLLO CUT-OFF 1x2.5 mL

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

Ag ANTIGENE Liofilo x 6 fiale

Contenuto: *Toxoplasma gondii* purificato in tampone fosfato contenente fluido ascitico di topo e lattosio.

Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta agitando per inversione.

CONJ CONIUGATO 1x18 mL

Contenuto: anticorpi monoclonali marcati con perossidasi, in soluzione di tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Preparazione: pronto all'uso.

L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

CONTROL IgM - IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0.09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1 x 100 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0.09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Pronto all'uso **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602) 1 x 16 mL

Soluzione di H₂SO₄ 0.3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2)

BUSTA DI POLIETILENE (1)

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 o 450/620 nm, con linearità fino ad OD ≥ 2.000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette. Capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 µl di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	15 gg 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C, al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
TAMPONE DI LAVAGGIO	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
SOLUZIONE BLOCCANTE	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Attenzione:

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero e i reagenti usati devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di legge vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi.

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'utilizzo del kit su strumenti automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento
 - manutenzione e assistenza tecnica

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati.

Il test non è applicabile a plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI i (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo.

Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL dell'immunocomplesso (Antigene/anticorpi monoclonali anti Toxoplasma marcati con Perossidasi) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DELLA PROVA

STEP 1 Mettere 100 µL di siero diluito/controlli nei pozzetti dello strip.

- Incubare 45 min. a 37°C

- Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 2 Mettere 100 µl di immunocomplesso per pozzetto

- Incubare 45 min. a 37°C

- Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 3 Mettere 100 µl di Substrato per pozzetto

- Incubare 15 min. a T.A.

STEP 4 Aggiungere 100 µl di Stop Solution

- Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (≤ 0.100) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio se eseguito in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere ≤ 0.6 . La DO del cut-off deve essere ≥ 0.200 a 450 nm e ≥ 0.160 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX).

Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $\pm 20\%$ del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo.

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

L'uso della metodologia immunoenzimatica "a cattura", ci pone al riparo da possibili risposte aspecifiche. Comunque i risultati del dosaggio devono essere interpretati con cautela e convalidati da valutazioni cliniche ed ulteriori prove diagnostiche.

Sieri di pazienti che si trovano in una fase precoce o tardiva della malattia, potrebbero dare un risultato ripetutamente negativo vicino al valore soglia del Cut-off. In tali casi si raccomanda di verificare il risultato, dosando un nuovo campione prelevato ad un intervallo di 7-10 giorni dal primo.

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 53 campioni di sieri contenenti potenziali interferenti:

- Anticorpi Antinucleo (ANA) (n=9)
- Fattore Reumatoide (n=6)
- Anticorpi eterofili (n=3)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubina (n=8)
- Trigliceridi (n=9)

In nessun caso si sono osservate interferenze

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica esterna, sono stati testati 357 campioni provenienti dalla routine e 68 provenienti da sieroteca. I campioni sono stati testati in confronto con un altro metodo commerciale immunoenzimatico; i casi discordanti venivano testati con la tecnica IFA dopo assorbimento degli anticorpi IgG (Test di Remington).

I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

		RIFERIMENTO	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

Il kit Enzy-Well ha una sensibilità del 98.4% ed una specificità del 98.9%.

15. PRECISIONE

Precisione nella prova

Campione	Repliche	Media (OD)	CV%
Controllo positivo	12	0.949	7.0
Controllo Cut-Off	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Precisione tra prove

Campione	Media (Index)					Media	CV%
	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 5		
Controllo positivo	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Precisione fra lotti

Campione	Index			Media	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi informazioni tecniche per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Lavaggio incompleto dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
4. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).
5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1082 (1968).



INSTRUCTIONS FOR USE

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO TOXOPLASMA GONDII IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF TOXOPLASMA INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Toxoplasma gondii is a ubiquitous protozoa which causes infection in all mammalian species. In man, serological studies have shown that a high percentage of the adult population has been infected by this parasite. The disease is particularly dangerous in immunodepressed patients during pregnancy, as it is transmitted from mother to fetus. For this reason it is important to determine the antibody titer before the beginning of pregnancy if possible; those subjects who do not present immunity should be followed up with frequent analyses to check for serum conversion.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test for the assay of *Toxoplasma* IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins and the subsequent identification of those which are specific, making use of their ability to bind an antigen conjugated to peroxidase. The capture is performed using monoclonal antibodies bound to the solid phase (microtiter wells). The antigen is composed of purified, inactivated and sonicated tachyzoites labelled with peroxidase bound to specific anti *Toxoplasma* monoclonal antibodies.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

- Reagents are sufficient for 96 determinations.
- **Bring to room temperature before use.**

MT PLATE MICROPLATE 12 x 8 wells coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.

Use: open the package at the opposite end from the code (M followed by the lot number) which is useful for its identification, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 1.6 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF CONTROL 1 x 2.5 mL

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

Ag ANTIGEN Freeze-dried powder x 6 vials

Contents: Purified *Toxoplasma gondii* in Phosphate buffer containing mouse ascitic fluid and lactose.

Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

CONJ CONJUGATE 1x18 ml

Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: ready for use.

The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

CONTROL IgM - IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) 1x1.6 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .
Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL 2 DILUENT 2 (PF93611) 1x100 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
 To be used to dilute samples.
Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619) 1x12 mL. Ready for use. **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602) 1x16 mL **INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS**
 H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2)

POLYTHENE BAG (1)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD ≥ 2.000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
MICROPLATE	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
CONTROLS	5 weeks at 2/8°C
CONJUGATE	5 weeks at 2/8°C
RECONSTITUTED ANTIGEN	15 days at 2/8°C
SUBSTRATE	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
SAMPLE DILUENT	until the expiry date at 2/8°C
WASH BUFFER	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
STOP SOLUTION	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution:

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Waste disposal: serum samples and reagents once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.**
Open the envelope containing the strips after at least 30 minutes at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be carefully mixed before the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided.

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare the immunocomplex by adding the Conjugate to the antigen (volume shown on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of the immunocomplex (Antigen-anti *Toxoplasma gondii* monoclonal antibodies labelled with peroxidase) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. SCHEME OF TEST PROCEDURE

STEP 1 Place 100 µl of diluted sample/controls in the wells of the strips.

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µl)

STEP 2 Add 100 µl of immunocomplex to each well

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µl)

STEP 3 Add 100 µl of Substrate to each well

-

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µl of Stop Solution

-

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (≤ 0.100) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum tested in triplicate must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 . The OD Cut-off must be ≥ 0.200 at 450 nm and ≥ 0.160 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-off, the sample is positive for the presence of specific IgM. Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX).

The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ of the Cut-off.

Negative: if the ratio is < 0.8 .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The use of the immunoenzymatic "capture" method precludes possible non-specific responses. However, the results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic procedures. Samples giving a repeatedly negative result close to the Cut-off value, may be seen in patients in an early or late stage of the disease. In such cases, a confirmation of the result is recommended, by testing a new sample drawn from the same patient at 7-10 days interval from the first sample.

Results must always be interpreted together with an evaluation of the clinical picture and other diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

53 serum samples ed containing potential interfering substances were test:

- Antinuclear antibodies (ANA) (n=9)
- Rheumatoid factor (n=6)
- Heterophile antibodies (n=3)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubin (n=8)
- Triglycerides (n=9).

No interference was noted in any case.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 357 samples from the routine practice and 68 from the serum collection were analysed with the present kit in parallel with another commercial immunoenzymatic kit. All discordant samples were analysed in the IFA technique after absorption of the IgG (Remington's test).

The results are reported in the following table.

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

The Enzy-Well kit has a sensitivity of 98.4% and a specificity of 98.9%.

15. PRECISION

In-run precision

Sample	Replicates	Mean (OD)	CV%
Positive control	12	0.949	7.0
Cut-Off control	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Inter-assay precision

Sample	Mean (Index)					Mean	CV%
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5		
Positive control	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Precision between lots

Sample	Index			Mean	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
4. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).
5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1082 (1968).



GEBRAUCHSANWEISUNG

ENZY-Well TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Deutsch)

1. VERWENDUNGSZWECK

TOXOPLASMA IGM IST EIN IMMUNENZYMATISCHER „CAPTURE ASSAY“ ZUR QUALITATIVEN BESTIMMUNG VON IGM-ANTIKÖRPERN GEGEN TOXOPLASMA GONDII IN HUMANEM SERUM.

2. PHYSIOLOGIE

Toxoplasma gondii ist ein weit verbreitetes Protozoon, das bei allen Säugetierspezies zu Infektionen führt.

Beim Menschen haben serologische Studien gezeigt, dass ein hoher Prozentsatz der erwachsenen Bevölkerung von diesem Parasiten infiziert ist. Die Erkrankung ist insbesondere während der Schwangerschaft gefährlich. Sie wird durch die Mutter auf den Fetus übertragen und führt zu schweren Missbildungen.

Aus diesem Grunde ist es wichtig, den Antikörpertiter möglichst vor Eintritt einer Schwangerschaft zu bestimmen. Patientinnen, die nicht immun sind, sollten regelmäßig auf eine Serokonversion hin überprüft werden.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der „Capture-Methode“ mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die an die Festphase gebunden sind. In der darauffolgenden Inkubation mit Toxoplasma-Antigen (gereinigte, inaktivierte Tachyzoiten) in einem Komplex mit monoklonalen Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gebunden sind, werden die antigenspezifischen IgM-Antikörper erfasst und durch die Zugabe von Peroxidase Substrat angezeigt. Wenn die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt wird, entsteht eine Gelbfärbung. Die entstandene Farbintensität ist proportional zu den in der Probe vorhandenen spezifischen Antikörpern. Sie kann auf einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden.

4. INHALT DES KITS UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Die Reagenzien sind ausreichend für 96 Bestimmungen.
- **Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.**

MT PLATE MIKROTITERPLATTE 12x8 Wells, beschichtet mit Anti-human-IgM-Antikörpern (monoklonal).

Gebrauch: Die Verpackung an der gegenüberliegenden Seite des Codes (M plus Lotnummer) öffnen und die nicht benötigten Streifen im beige-fügten Plastikbeutel mit dem Silica Gel lagern; die Luft herausdrücken und gut verschließen.

CONTROL + POSITIVKONTROLLSERUM 1x1.6 mL

Inhalt: verdünntes Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig.

Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

CONTROL CUT-OFF CUT-OFF KONTROLLSERUM 1x2.5 mL

Inhalt: verdünntes Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, mit 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig.

Farbe: Die Farbe der Kontrolle ist proportional zum relativen Antikörpertiter.

Ag ANTIGEN Lyophilisiert; 6 Fläschchen.

Inhalt: gereinigtes Toxoplasma gondii, in Phosphatpuffer, mit Aszitesflüssigkeit (Maus) und Laktose.

Rekonstitution: Mit Konjugat rekonstituieren. Das Rekonstitutionsvolumen ist auf den Fläschchenetiketten angegeben.

CONJ KONJUGAT 1x18 mL

Inhalt: monoklonale Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, in Phosphatpuffer mit 0.05% Phenol und 0.02% Bronidox.

Vorbereitung: Gebrauchsfertig.

Der Immunkomplex sollte 45 Minuten vor Gebrauch hergestellt werden.

CONTROL IgM - IgM NEGATIVKONTROLLE (PF93910) 1 x 1.6 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Verdünntes Humanserum in 0.01 mol/l Phosphatpuffer, 1% BSA und 0.09% Natriumazid; flüssig, gebrauchsfertig ohne weitere Verdünnung.

WASH BUF 10x WASCHPUFFER 10X (PF93603) 1x 100 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, 10fach konzentriert; enthält 0.5% Brij.

Vorbereitung: Verdünnen Sie die benötigte Menge 1:10 mit destilliertem Wasser, um den gebrauchsfertigen Waschpuffer herzustellen. Falls Kristalle vorhanden sind, sollten sie vor der Verdünnung bei 37 °C gelöst werden.

SAMP DIL 2 VERDÜNNUNGSMITTEL 2 (PF93611) 1x100 mL Für die Verdünnung von Proben. **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: Proteinlösung in Phosphatpuffer mit 0.09 % Natriumazid und Methylorange.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Gebrauchsfertig **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: 0.26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0.01% Wasserstoffperoxid, stabilisiert in 0.05 mol/l Zitratpuffer (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOPPLÖSUNG (PF93602) 1x16 mL **LOTS UNTEREINANDER AUSTAUSCHBAR**

Inhalt: H₂SO₄ 0.3 mol/l, in gebrauchsfertiger Lösung.

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

ABDECKFILM (2)

POLYEHTYLENBEUTEL (1)

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN

- Inkubator bei 37°C
- Mikrotiterplatten Reader, Wellenlänge 450 oder bei 450/620 nm, mit einer OD-Linearität bis ≥ 2.000
- Washer für Mikrotiterplatten (empfehlenswert) für ein Dispenservolumen zwischen 225-375 μ l
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Normale Laborgläser: Zylinder, Teströhrchen etc.
- Mikropipetten für die exakte Pipettierung von 10, 100, 1000 μ l
- Einweg-Handschuhe
- Timer
- Natriumhypochlorid-Lösung (5%)
- Behälter zum Sammeln von potentiell infektiösem Material
- Saugfähiges Papier

5. LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

Die Reagenzien müssen bei 2-8 °C gelagert werden.

Das Verfallsdatum ist auf allen Kitkomponenten und dem Packungsetikett angegeben.

Die Reagenzien haben nach dem ersten Öffnen und/oder der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität.

REAGENZ	KONDITIONEN
MIKROTITERPLATTE	5 Wochen bei 2-8°C im Polyethylenbeutel
KONTROLLSEREN	5 Wochen bei 2-8°C
KONJUGAT	5 Wochen bei 2-8°C
IMMUNKOMPLEX	15 Tage bei 2-8°C
SUBSTRAT	bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C, 1 Woche bei 15-30°C im Dunkeln
VERDÜNNUNGSMITTEL	bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C
WASCHPUFFER	2 Wochen bei 2-8°C, 5 Tage bei 15-30°C.
STOPPLÖSUNG	bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO DIAGNOSTIK

Achtung:

Dieser Kit enthält Bestandteile humanen Ursprungs, die mit einer FDA-geprüften Methode für HbsAg, Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ waren. Da keine Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen kann, dass Produkte humanen Ursprungs infektiöse Erreger enthalten, sollten alle Materialien humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Alle Materialien sollten gemäß GLP („Gute Laborpraxis“) behandelt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serum-Proben und die verwendeten Reagenzien müssen als infizierte Abfälle behandelt werden, das heißt, im Einklang mit den geltenden Vorschriften entsorgt werden.

Gesundheits- und Sicherheitsinformationen

7. Nicht mit dem Mund pipettieren. Tragen Sie Einweg-Handschuhe und einen Augenschutz während des Umgangs mit Proben und der Testdurchführung. Waschen Sie sich danach gründlich die Hände.
8. Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen von schädlichen oder reizenden Substanzen:
 Der Waschpuffer enthält Detergenzien
 Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol.
 Das Substrat ist eine Säure.
 Die Kontrollen enthalten 0,09 % Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden.
 Falls irgendeines der Reagenzien in Kontakt mit den Augen oder der Haut kommt, waschen Sie den Bereich intensiv mit Wasser.
9. Mehrfach verwendbare Materialien oder Gegenstände sollten nach Gebrauch sterilisiert werden. Die bevorzugte Methode ist das Autoklavieren für eine Stunde bei 121°C, Einwegmaterialien sollten autoklaviert oder verbrannt werden.
10. Schwefelsäure (Stop Solution) und Salzsäure (wird für das Waschen der Laborgläser benötigt) sind ätzend und sollten mit entsprechender Sorgfalt behandelt werden. Bei Kontakt mit Augen oder Haut gründlich mit Wasser abwaschen.
11. Neutralisierte Säuren oder anderer Flüssigabfall sollten mit einer ausreichenden Menge von Natriumhypochlorid mit einer Endkonzentration von mindestens 1% dekontaminiert werden. Eine 30-minütige Behandlung mit Natriumhypochlorid 1% ist erforderlich, um eine effektive Dekontamination sicherzustellen.
12. Verschüttete potentiell infektiöse Materialien sollten sofort mit saugfähigem Papier aufgewischt werden, und der kontaminierte Bereich sollte mit Natriumhypochlorid 1% nachgewischt werden, bevor die Arbeit fortgesetzt wird. Natriumhypochlorid sollte nicht bei verschütteter Flüssigkeit, die Säure enthält, verwendet werden, bevor die Flüssigkeit trocken aufgewischt wurde. Materialien, die für das Aufwischen verschütteter Flüssigkeiten verwendet wurden, inklusive der Handschuhe, sollten wie potentiell biogefährdender Abfall entsorgt werden. Autoklavieren Sie keine Materialien, die Natriumhypochlorid enthalten.

Technische vorsichtsmassnahmen

14. Bringen Sie alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-30°C). Bringen Sie die Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf die empfohlene Lagerungstemperatur. **Es ist wichtig, bei der korrekten Temperatur zu arbeiten. Überprüfen Sie, dass der Thermostat nicht unterhalb 35° und nicht über 39°C anzeigt.** Öffnen Sie die Packung mit den Streifen erst nach 30 Minuten bei Raumtemperatur.
15. Verwenden Sie die Reagenzien nicht über das angegebene Verfalldatum hinaus. Mikrobiologische Kontamination der Reagenzien muss vermieden werden, da dies die Halbarkeit des Produktes reduzieren und zu falschen Ergebnissen führen kann.
16. Die Testdurchführung darf nicht verändert, die Reagenzien dürfen nicht durch Reagenzien von anderen Herstellern oder aus anderen Lots ersetzt werden, es sei denn, dass die Austauschbarkeit von Lots extra angegeben ist. Reduzieren Sie keine der Inkubationszeiten.
17. Die für die Reagenzien verwendeten Laborgläser sollten gründlich mit 2M Salzsäure gewaschen und dann mit destilliertem oder deionisiertem Wasser von guter Qualität gespült werden.
18. Setzen Sie die Reagenzien keiner starken Lichteinstrahlung oder Hypochlorid-Dämpfen während der Lagerung oder der Inkubationsschritte aus.
19. Lassen Sie die Wells während der Testdurchführung nicht trocken werden.
20. Vermeiden Sie Verschleppungen beim Pipettieren. Es ist wichtig, dass die Pipetten nur für den alleinigen Gebrauch der verschiedenen Reagenzien eingesetzt werden.
21. Das Berühren oder Bespritzen des Randes der Wells mit Konjugat sollte sorgfältig vermieden werden. Verschütten Sie keine Flüssigkeit aus den Wells.
22. Enzymimmunoassays können gelegentlich einen "Edge-Effect" zeigen, der durch eine Steigerung der Luftfeuchtigkeit während der Inkubationsschritte minimiert werden muss. Die Platten müssen mit Film abgedeckt und bei 37 °C entweder im Wasserbad (mit einem Rack oder einem Schwimmer, um die Platten zu halten, sofern nötig,) oder in einem Inkubator inkubiert werden. Alternativ können die Platten in einem überprüften Analysengerät inkubiert werden. Weitere Details entnehmen Sie bitte der entsprechenden Gebrauchsanweisung des Gerätes. Verwenden Sie keine CO₂ Inkubatoren.
23. Stellen Sie sicher, dass der Boden der Platte sauber und trocken ist, und dass vor dem Lesen der Platte keine Blasen auf der Oberfläche der Flüssigkeit vorhanden sind.
24. Die Verwendung von stark hämolysierten Proben, unvollständig geronnenen Seren oder mikrobiell kontaminierten Proben führt zu falschen Ergebnissen.

25. Die Benutzung der Methode mit automatischen Instrumenten muss von dem Anwender bestätigen werden
26. Lesen Sie vor der Verwendung eines Gerätes sorgfältig die Gebrauchsanweisung des Herstellers, damit Sie zu folgenden Punkten Zusatzinformationen erhalten:
 - Installation und besondere Bedarfsartikel
 - Arbeitsprinzip, Hinweise zur Testdurchführung, Vorsichtsmaßnahmen und Risiken
 - Vorgegebene Spezifikationen des Herstellers und Arbeitsweise des Gerätes
 - Service und Wartung

7. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Als Probenmaterial wird Serum eingesetzt, das auf die übliche Art aus der Vene unter Berücksichtigung der „Guten Laborpraxis“ entnommen wird. Das frische Serum kann 4 Tage bei 2-8°C oder für einen längeren Zeitraum bei -20 °C gelagert werden. Die Proben dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden. Aufgetaute Den Gebrauch von Tiefkühlschränken mit automatischem Abtausystem für die Aufbewahrung der Proben vermeiden. Proben müssen vor Gebrauch sorgfältig geschüttelt werden. Eine Hitzeinaktivierung kann zu falschen Ergebnissen führen. Die Qualität einer Probe kann aber durch mikrobielle Kontamination ernsthaft beeinflusst werden und führt zu falschen Ergebnissen.

Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben sollten nicht in diesen Assay eingesetzt werden.

Es dürfen keine Plasmaproben in diesen Assay eingesetzt werden!

8. TESTDURCHFÜHRUNG

- Bereiten Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen vor.
- Bereiten Sie den Waschpuffer vor: Verdünnen Sie den Wash Buffer 1:10 mit destilliertem Wasser (Beispiel 100 ml + 900 ml H₂O).
- Bereiten Sie den Immunkomplex vor, indem Sie das lyophilisierte Antigen mit Konjugat rekonstituieren. Das erforderliche Konjugatvolumen ist auf dem Antigen-Fläschchenetikett angegeben.

Verdünnen Sie die Proben 1:101, indem Sie 10 µl der Probe 1,0 ml verdünntes Diluent zufügen. Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Probe in die entsprechenden Wells (Doppelbestimmungen werden empfohlen). 100 µl unverdünnte Positiv-, Negativkontrolle (Doppelbestimmung) und unverdünntes Cut-Off-Serum (Dreifachbestimmung) in je eine Well pipettieren. (Das Minimum sind 1 Negativkontrolle, 2 Cut-Off und 1 Positivkontrolle.) Lassen Sie eine Well für den Substratleerwert frei (100 µl Substrat pipettieren).

- Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37°C inkubieren lassen.
- 4-mal mit 300 Waschpuffer waschen (mit jeweils 30 Sekunden Einwirkzeit).
- 100 µl Immunkomplex in alle Wells pipettieren (außer Substratleerwert).
- Die Wells mit Folie abdecken und 45 Minuten bei 37°C inkubieren lassen.
- 4-mal wie oben beschrieben waschen.
- 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
- 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- 100 µl Stop Solution in alle Wells pipettieren (auch Substratleerwert).
- Die Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm oder 450/620 nm messen.

9. TESTSCHEMA

1. 100 µl der verdünnten Probe und unverdünnten Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettieren.
2. 45 Min. bei 37°C inkubieren.
3. 4-mal waschen (300).
4. 100 µl Immunkomplex in alle Wells pipettieren.
5. 45 Min. bei 37°C inkubieren.
6. 4-mal waschen (300).
7. 100 µl Substrat in alle Wells pipettieren.
8. 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren.
9. 100 µl Stopplösung hinzufügen.
10. Messen Sie die Extinktion bei 450 nm innerhalb von 30 Min.
11. Bei Readern mit 2 Wellenlängen stellen Sie den Referenzfilter auf 450-620 nm ein.

10. TESTVALIDIERUNG

Subtrahieren Sie den Substratleerwert (≤ 0.100) von allen Extinktionen. Die Extinktion der Einzelwerte des Cut-Off-Serums muss bei einer Dreifachbestimmung innerhalb von $\pm 25\%$ des Extinktionsmittelwertes liegen. Ausreißer werden ggf. eliminiert, und der Mittelwert wird anschließend neu berechnet. Die Extinktion der Positivkontrolle muss

mindestens das 1.5 fache der Extinktion des Cut-Off-Serums betragen, die Extinktion der Negativkontrolle muss ≤ 0.6 fache des Cut-Off Serums betragen. Die OD des Cutoff muss ≥ 0.200 bei 450 nm und ≥ 0.160 bei 450/620 nm sein.

11. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Qualitative ergebnisse

Wenn die Extinktion der Probe höher als die des Cut-Off-Serums ist, enthält die Probe spezifische Toxoplasma-IgM-Antikörper.

Berechnen Sie das Verhältnis zwischen Extinktionsmittelwert der Probe und dem des Cut-Off (INDEX).

Positiv: > 1.2

Zweifelhaft: $\pm 20 \%$ des Cuf-off.

Negativ: < 0.8

Falls das Ergebnis zweifelhaft ist, wiederholen Sie den Test. Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Probe, falls das Ergebnis zweifelhaft bleibt.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Verwendung der immunenzymatischen „Capture“-Methode verhindert mögliche nichtspezifische Ergebnisse.

Trotzdem sollte zur Erstellung einer Diagnose die Bestimmung von Toxoplasma gondii immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

Proben mit wiederholt negativen Ergebnisse nahe am Cut-off können bei Patienten im frühen oder späten Stadium der Erkrankung beobachtet werden. In solchen Fällen wird eine Bestätigung des Ergebnisses empfohlen, indem eine Probe desselben Patienten 7-10 Tage später erneut getestet wird.

Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

53 Serumproben, die potentiell interferierende Substanzen enthielten, wurden gemessen:

- Antinukleäre Antikörper (ANA) (n=9)
- Rheumafaktor (n=6)
- Heterophile Antikörper (n=4)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubin (n=8)
- Triglyceride (n=9)

In keinem Fall wurde dieser Test durch das Vorhandensein dieser Antikörper beeinflusst.

14. DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

In einer Studie in einem Krankenhauslabor wurden 357 Proben aus der Routine und 68 aus der Serenbank mit diesem Kit und parallel mit einem anderen kommerziellen Enzymimmunoassay getestet. Alle diskordanten Proben wurden mit der IFA-Methode nach Absorption der IgGs (Remington's Test) verglichen.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

		RIFERENZ	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

Der Enzy-Well assay bietet 98.4% Sensitivität und 98.9% Spezifität.

15. PRÄZISION

Intraassay-Präzision

Probe	Repliken	Mittelwert (OD)	CV%
Positivkontrollserum	12	0.949	7.0
Cut-Off kontrollserum	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Interaassay-Präzision

Probe	Mittelwert (Index)					Mittelwert	CV%
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5		
Positivkontrollserum	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Lot-zu-Lot-Präzision

Probe	Index			Mittelwert	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. “TROUBLESHOOTING” (PROBLEMLÖSUNGEN)

PROBLEM	MÖGLICHE URSACHE	MÖGLICHE PROBLEMLÖSUNG
Ungültiger Testrun (alle negativ)	Eins oder mehrere Reagenzien wurden nicht zugefügt oder in der falschen Reihenfolge.	Überprüfen Sie die Testdurchführung. Suchen Sie nach evt. ungenutzten Reagenzien. Wiederholen Sie den Test.
	Nichtreaktive Platte	Prüfen Sie den Code auf der Plattenpackung. (Der korrekte Code ist in der Gebrauchsanweisung unter Punkt 4 angegeben.)
		Prüfen Sie, ob die ungenutzte Platte feucht ist. (Das Silica-Gel Trockenmittel muss blassgelb sein.) Wiederholen Sie den Test.
Ungültiger Testrun (alle positiv)	Kontamination des Substrates	Nehmen Sie ein neues Substrat.
	Unvorschriftsmäßiges Waschen	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
Schlechte Präzision	Unvollständiges Waschen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Unvorschriftsmäßiges Absaugen der Wells	Stellen Sie sicher, dass der Washer korrekt arbeitet.
	Pipettierfehler	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.
	Reagenzienzugabe zu langsam	Vermeiden Sie ein Austrocknen der Platte nach dem Waschschrift. Geben Sie sofort danach die Reagenzien zu.
	Vorhandensein von Luftblasen	Vermeiden Sie Luftblasen während des Pipettierens.
	Optischer Weg nicht sauber	Überprüfen Sie die Lichtquelle und den Detektor auf Verschmutzung. Reinigen Sie den Boden der Platte mit einem weichen Tuch.
Nicht ausreichende Farbentwicklung	Unvorschriftsmäßige Inkubationszeit oder -temperatur	Prüfen Sie die Temperaturkontrolle und die Zeitüberwachung.
		Beachten Sie die Vorschriften in der Gebrauchsanweisung.
	Unvorschriftsmäßiges Pipettiervolumen von Substrat	Prüfen Sie die Pipettierfunktion.

16. LITERATUR

6. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
7. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).

8. F. Wielaard, H. van Gruijthuijsen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 17: 981 (1983).
9. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 196 (1985).
10. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 41: 1082 (1968).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΛΛΗΨΗΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgM ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΤΟΞΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ GONDII ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Τοξοπλάσμα gondii είναι ένα πρωτόζωο ευρέως διαδεδομένο, ικανό να προκαλέσει λοίμωξη σε όλα τα είδη των θηλαστικών. Ορολογικές μελέτες απόδειξαν ότι στον άνθρωπο, ένα υψηλό ποσοστό του ενήλικου πληθυσμού έχει προσβληθεί από αυτόν τον παρασιτικό οργανισμό. Η νόσος είναι ιδιαίτερα επιβλαβής σε ασθενείς που πάσχουν από ανοσοκαταστολή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, γιατί μεταδίδεται από την μητέρα στο έμβρυο. Γι' αυτό τον τελευταίο λόγο έχει μεγάλη σημασία να είναι γνωστή η συγκέντρωση των αντισωμάτων πριν από την εγκυμοσύνη και, στα άτομα εκείνα που δεν παρουσιάζουν ανοσία, να γίνονται συχνές αναλύσεις αν παρουσιαστεί ορομετατροπή. Η ορολογική διάγνωση του Τοξοπλάσματος μπορεί να γίνει προσδιορίζοντας τα ειδικά IgM επειδή αυτά τα αντισώματα, σε συνδυασμό με τα κλινικά συμπτώματα, έχουν μεγάλη σημασία στη διάγνωση.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ προσδιορισμού των IgM κατά του Τοξοπλάσματος, βασίζεται στην αρχή της σύλληψης και της συλλογής αυτών των ανοσοσφαιρινών και στην μετέπειτα αντίγνωση εκείνων των ειδικών, εκμεταλλευόμενοι την ικανότητά τους να συνδέονται με ένα αντιγόνο συζευγμένο με υπεροξειδάση.

Η σύλληψη και συλλογή γίνεται με μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα με τη στερεά φάση (κυψελίδες με μικροπλακίδια στη συσκευή). Το αντιγόνο αποτελείται από κεκαθαρμένους, αδρανοποιημένους και κατεργασμένους με υπερήχους ταχυζώιτες, σεσημασμένους με υπεροξειδάση συνδεδεμένη με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα κατά του Τοξοπλάσματος.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ KIT ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.
- **Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση.**

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12x8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgM.

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Μ ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε την βάση και τις απαραίτητες ταινίες. Βάλτε πάλι πίσω στη σακούλα από πολυαιθυλένιο, που περιέχει γέλη πυριτίας, τις ταινίες που δεν χρησιμοποιήσατε, αφαιρέστε τον αέρα και σφραγίστε την πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος.

CONTROL + ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΘΕΤΙΚΟΣ 1x1.6 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

CONTROL CUT-OFF ΕΛΕΓΧΟΣ CUT-OFF 1x2.5 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο του νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραιώση.

Χρώμα: το χρώμα είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αντισωμάτων.

Ag ΑΝΤΙΓΟΝΟ Κρυο-αφυδατωμένο x 6 αμπούλες

Περιεχόμενο: Κεκαθαρμένος Ιός Τοξοπλάσματος gondii, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, που περιέχει υγρό ασκική μυός και γαλακτόζη.

Προετοιμασία: Κάνετε την ανασύσταση προσθέτοντας τον όγκο του συζυγούς που αναγράφεται στην ετικέτα και ανακατέψτε στη συνέχεια αναποδογυρίζοντας το διάλυμα.

CONJ ΣΥΖΥΓΕΣ 1x18 mL

Περιεχόμενο: μονοκλωνικά αντισώματα σεσημασμένα με υπεροξειδάση, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%.

Προετοιμασία: έτοιμο για χρήση.

Το ανοσοσύμπλοκο πρέπει να έχει προετοιμαστεί 45 λεπτά πριν από τη χρήση.

CONTROL IgM - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgM (PF93900) 1x1.6 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.01 mol/L με BSA 1% και αζίδιο νατρίου 0.09%, υγρός, έτοιμος για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1x100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (PBS) συμπυκνωμένο 10 φορές, που περιέχει Brij 0.5%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:10 με αποσταγμένο νερό για να παρασκευάσετε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης έτοιμο για χρήση. Αν σχηματιστούν κρύσταλλοι, διαλύστε τους στους 37°C πριν την αραίωση.

SAMP DIL 2 ΔΙΑΛΥΤΗΣ 2 (PF93611) 1x100 mL **ΚΟΙΝΟΣ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Χρησιμοποιείται για την αραίωση των δειγμάτων.

Περιεχόμενο: Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) με πρωτεΐνες, αζίδιο του νατρίου 0.09% και χρωστική ουσία (πορτοκαλί του μεθυλίου).

SUBS TMB ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (PF93619) 1x12 mL Έτοιμο για χρήση **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H₂O₂ 0.01% σταθεροποιημένα σε κυτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1x16 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

Διάλυμα H₂SO₄ 0.3 mol/L έτοιμο για χρήση.

ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΤΑΙΝΙΑ (2)**ΣΑΚΟΥΛΑ ΑΠΟ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΙΟ (1)****ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.**

- Επωαστήριο σε 37°C
- Αναγνώστης μικροπλακιδίων (μήκος κύματος 450 ή 450/620 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. ≥ 2.000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μ L
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
- Γάντια μίας χρήσης
- Χρονόμετρο
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.
- Απορροφητικό χαρτί
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 10,100,1000 μ L διαλύματος

5. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C.

Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε σετ και στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια σταθερότητας μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ**ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ****ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ****ΣΥΖΥΓΕΣ****ΑΝΑΣΥΣΤΑΘΕΝ ΑΝΤΙΓΟΝΟ****ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ****ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ****ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ****ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ****ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

5 εβδομάδες στους 2/8°C μέσα στην σακούλα από πολυαιθυλένιο

5 εβδομάδες στους 2/8°C

5 εβδομάδες στους 2/8°C

15 ημέρες στους 2/8°C

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C, 1 εβδομάδα σε 15/30°C στο σκοτάδι

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

έτοιμο για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C, 5 ημέρες σε 15/30 °C

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΟΔΗΓΙΕΣ**ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΤΕ ΣΤΟΥΣ 2-8°C****Προσοχή:**

Αυτή η συσκευασία περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από ελέγχους και έχουν βρεθεί αρνητικά, σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διαχείριση των κατάλοιπων: τα δείγματα του ορού και ο αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να αντιμετωπίζονται ως κατάλοιπα δυνητικά μολυσματικά και να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

7. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μετά από κάθε ανάλυση.
8. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
 - α) το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης περιέχει ουσίες καθαρισμού
 - β) το συζυγές περιέχει φαινόλη
 - γ) το υπόστρωμα είναι όξινο
 - δ) Οι βαθμονομητές περιέχουν Αζίδιο Νατρίου (0,09%) το οποίο μαζί με τον χαλκό και τον μόλυβδο μπορεί να σχηματίσει ισχυρά εκρηκτικά αζιδικά ιζήματα μετάλλων.

Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.

9. Οι συσκευές που δεν είναι μίας χρήσης, πρέπει να αποστειρώνονται, κατά προτίμηση στον κλίβανο, για 1h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θεικό οξύ, που περιέχεται στο Stop Solution και το υδροχλωρικό οξύ που χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα του υάλινου εξοπλισμού, είναι διαβρωτικά και γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή. Σε περίπτωση που έρθουν σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
11. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες, είναι αρκετή για να γίνει μία αποτελεσματική απολύμανση.
12. Τυχόν χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η επιφάνεια να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την διαδικασία ανάλυσης. Αν τα υγρά περιείχαν ένα οξύ, τότε στεγνώστε πολύ καλά την επιφάνεια πριν χρησιμοποιήσετε το υποχλωριώδες νάτριο. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Οδηγίες για την ανάλυση

14. Πριν από την χρήση φέρτε τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) Βάλτε και πάλι τα αντιδραστήρια στη συνιστώμενη θερμοκρασία αποθήκευσης, αμέσως μετά τη χρήση. **Η σωστή θερμοκρασία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την επώαση των ταινιών. Βεβαιωθείτε ότι ο θερμοστάτης δεν κατεβαίνει κάτω από τους 35°C και δεν ανεβαίνει πάνω από τους 39°C.**
Ανοίξτε την σακούλα με τις ταινίες (strip) αφού την έχετε αφήσει τουλάχιστον μισή ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
15. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους. Να αποφεύγετε την μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων γιατί αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας του προϊόντος και μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα.
16. Μην αλλάξετε την όλη Διαδικασία και μην αντικαταστήσετε τα αντιδραστήρια με άλλα διαφορετικής μάρκας ή με άλλα από διαφορετικές παρτίδες, εκτός και αν το αντιδραστήριο είναι κοινό σε όλες τις παρτίδες. Μην μειώνετε τον υποδεικνυόμενο χρόνο επώασης.
17. Όλος ο υάλινος εξοπλισμός πρέπει να απολυμαίνεται προσεκτικά με υδροχλωρικό οξύ 2M και να ξεπλένεται με αποσταγμένο ή με απιονισμένο νερό.
18. Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια σε ισχυρό φωτισμό ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς, τόσο κατά την αποθήκευσή τους όσο και κατά την επώασή τους.
19. Οι κυψελίδες δεν πρέπει να ξεραίνονται, κατά την διάρκεια των τεστ.
20. Να αποφεύγετε την διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείτε πάντοτε τις ειδικές πιπέτες.

21. Μην ακουμπάτε το χείλος της κυψελίδας με το συζυγές. Μην φυσάτε πάνω στα μικροπλακίδια.
22. Οι ανοσοενζυμικές αναλύσεις μπορεί να παρουσιάσουν καμιά φορά στα άκρα ένα ειδικό φαινόμενο ("edge effect"), το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί αυξάνοντας τον βαθμό υγρασίας κατά την επώαση. Τα πλακίδια πρέπει να καλύπτονται με το ειδικό κάλυμμα και να επωάζονται στους 37°C ή σε ζεστό υδατόλουτρο, τοποθετώντας τα πάνω σε ένα υποστήριγμα, ή στη συσκευή επώασης. Ως εναλλακτική λύση τα πλακίδια μπορεί να επωαστούν σε έναν κατάλληλο αναλύτη. Για περισσότερες πληροφορίες, συμβουλευτείτε το εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής. Μην χρησιμοποιείτε συσκευές επώασης που λειτουργούν με CO₂.
23. Πριν από την ανάγνωση του πλακιδίου, βεβαιωθείτε ότι ο πυθμένας του είναι καθαρός και στεγνός και ότι δεν υπάρχουν φυσαλίδες αέρα στην επιφάνεια του υγρού.
24. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, οροί με ατελή πήξη, ή δείγματα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυνση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
25. Η χρήση ενός κιτ με αυτόματες συσκευές, πρέπει να ελεγχθεί και να επικυρωθεί από τον χρήστη.
26. Διαβάστε με προσοχή το εγχειρίδιο χρήσης κάθε συσκευής που χρησιμοποιείτε, και ειδικά τα εξής σημεία:
 - εγκατάσταση και ειδικές προδιαγραφές
 - λειτουργική αρχή, οδηγίες, προφυλάξεις, κίνδυνοι
 - προδιαγραφές του κατασκευαστή και λειτουργικές αποδόσεις της συσκευής
 - συντήρηση και τεχνική υποστήριξη.

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που προέρχεται από αίμα που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς των εργαστηρίων. Ο νοπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C, ενώ για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξετε στους -20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη και πριν να το ρίξετε στην κυψελίδα, ανακινήστε το καλά.. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος, και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Δείγματα με ισχυρή αιμόλυση, με ίκτερο, λιπαιμικά ή μολυσμένα, δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.

Το τεστ δεν μπορεί να γίνει πάνω σε ανθρώπινο πλάσμα αίματος.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Προετοιμάστε τις απαραίτητες ταινίες
- Προετοιμάστε το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης αραιώνοντας το Wash Buffer 10x (100 ml + 900 ml H₂O)
- Προετοιμάστε το αντιγόνο, κάνοντας την ανασύσταση του κρυο-αφυδατωμένου με το συζυγές (ο όγκος που είναι απαραίτητος υποδεικνύεται στην ετικέτα).

Αραιώστε τα δείγματα σε αναλογία 1:101 ρίχνοντας 10 μL ορού σε 1 mL διαλύτη και ρίξτε 100 μL κάθε αραιωμένου δείγματος σε κάθε κυψελίδα (σας συμβουλευουμε να κάνετε την ανάλυση εις διπλούν). Σε μία ταινία ρίξτε τους ορούς ελέγχου ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΡΑΙΩΣΕΤΕ (100 μL ανά κυψελίδα). Η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα είναι 1 ορός ελέγχου αρνητικός, 2 cut-off και 1 θετικός.

Αφήστε μία κυψελίδα ελεύθερη για την ανάλυση του τυφλού δείγματος, χρησιμοποιώντας μόνο 100 μL υποστρώματος.

Καλύψτε τις κυψελίδες με την προστατευτική ταινία και βάλτε τις να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά από 4 εκπλύσεις, διάρκειας 30 δευτερολέπτων η κάθε μία (300 μl) προσθέστε 100 μL ανοσοσυμπλόκου (μονοκλωνικό αντιγόνο /αντίσωμα αντι-Ιού Τοξοπλάσματος σεσημασμένο με Υπεροξειδάση) σε κάθε μία κυψελίδα και βάλτε τις και πάλι να επωαστούν για 45 λεπτά στους 37°C, καλύπτοντάς τις με την προστατευτική ταινία. Ξεπλύνετε και πάλι το πλακίδιο 4 φορές, όπως υποδεικνύεται παραπάνω, και στη συνέχεια ρίξτε το Υπόστρωμα, 100 μL/ανά κυψελίδα.. Μετά από 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διακόψτε την ενζυμική αντίδραση με 100 μL Stop Solution. Διαβάστε την Απορρόφηση (Ο.Π) στα 450 nm ή στα 450/620 nm μέσα σε 30 λεπτά.

9. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- | | |
|--------|--|
| STEP 1 | Ρίξτε 100 μL αραιωμένου ορού/ορών ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας |
| | - |
| | Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C |
| | - |
| | Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl) |
| | - |
| STEP 2 | Ρίξτε 100 μL ανοσοσυμπλόκου σε κάθε κυψελίδα |
| | - |
| | Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C |
| | - |
| | Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl) |

- STEP 3 Ρίξτε 100 µL Υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα
- Επωάστε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- STEP 4 Προσθέστε 100 µl Stop Solution
- Διαβάστε την Ο.Π. στα 450 nm μέσα σε 30 λεπτά

10. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Αφαιρέστε την τιμή του τυφλού (≤ 0.100) από όλες τις άλλες τιμές. Οι τιμές σε Ο.Π. του ορού ελέγχου Cut-off, όταν αναλύεται εις τριπλούν, πρέπει να κυμαίνονται μέσα στο 25% της μέσης τιμής. Απορρίψτε την μη φυσιολογική τιμή και υπολογίστε και πάλι την μέση τιμή. Ο θετικός ορός πρέπει να έχει Ο.Π. ίση με 1,5 τουλάχιστον φορά την τιμή του Cut-off. Ο λόγος μεταξύ Αρνητικού ορού και Cut-off πρέπει να είναι ≤ 0.6 . Η Ο.Π. του cut-off πρέπει να είναι ≥ 0.200 στα 450 nm και ≤ 0.160 στα 450/620 nm.

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Ποιοτικά αποτελέσματα

Αν η τιμή της απορρόφησης του δείγματος είναι μεγαλύτερη από τον Cut-off το δείγμα προκύπτει θετικό λόγω της παρουσίας των ειδικών IgM.

Υπολογίστε τον λόγο μεταξύ της τιμής της Ο.Π. του υπό εξέταση δείγματος και εκείνης του Cut-off (INDEX).

Το δείγμα θα κριθεί:

Θετικό: όταν ο λόγος είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: $\pm 20\%$ του Cut-off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος είναι < 0.8 .

Σε περίπτωση αμφίβολου αποτελέσματος, επαναλάβετε το τεστ. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο επαναλάβετε την αιμοληψία.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Η χρήση της ανοσοενζυμικής μεθόδου σύλληψης, αποκλείει πιθανές μη-ειδικές αποκρίσεις. Παρ' όλα αυτά τα αποτελέσματα της ανάλυσης πρέπει να ερμηνευθούν με επιφύλαξη και να επικυρωθούν σε συνδυασμό με άλλα δεδομένα από κλινική αξιολόγηση και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.

Οροί ασθενών που βρίσκονται στο πρώτο ή σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, μπορεί να δώσουν αποτέλεσμα κατ' επανάληψη αρνητικά, κοντά στην οριακή τιμή κατωφλίου (Cut-Off). Σε τέτοια περίπτωση συνιστάται η εξακρίβωση του αποτελέσματος αναλύοντας ένα νέο δείγμα σε χρονικό διάστημα 7-10 ημερών από το πρώτο.

Τα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται μαζί με άλλα δεδομένα που προέρχονται από κλινική αξιολόγηση και από άλλες διαγνωστικές αναλύσεις.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Αναλύθηκαν 53 δείγματα ορών που περιείχαν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες:

- Αντιπυρηνικά Αντισώματα (ANA) (n=9)
- Ρευματοειδής Παράγοντας (n=6)
- Ετερόφιλα αντισώματα (n=3)
- IgM Κυτταρομεγαλοϊού (n=18)
- Χολερυθρίνη (n=8)
- Τριγλυκερίδια (n=9)

Δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές σε καμία περίπτωση.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν εξωτερικό κλινικό πειραματισμό, αναλύθηκαν 357 δείγματα προερχόμενα από αναλύσεις ρουτίνας και 68 από αρχείο διατήρησης ορών. Τα δείγματα αναλύθηκαν συγκριτικά και με μίαν άλλη ανοσοενζυμική εμπορική μέθοδο. Τα δείγματα, στα οποία υπήρξε ασυμφωνία αναλύθηκαν με την μέθοδο IFA μετά την απορρόφηση των αντισωμάτων IgG (Τεστ του Remington).

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

	ΑΝΑΦΟΡΑ	
	+	-
	63	4
DIESSE	1	357

Το kit Enzywell παρουσιάζει ευαισθησία 98.4% και ειδικότητα 98.9%.

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Ακρίβεια κατά την ανάλυση

Δείγμα	Επαναλαμβανόμενες μετρήσεις	Μέση Τιμή (OD)	CV%
Ορος Ελεγχου Θετικός	12	0.949	7.0
Cut-Off	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων

Δείγμα	Μέση Τιμή (Index)					Μέση Τιμή	CV%
	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4	Ημέρα 5		
Ορος Ελεγχου Θετικός	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Ακρίβεια μεταξύ παρτίδων

Δείγμα	Index			Μέση Τιμή	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. ΟΔΗΓΟΣ ΕΠΙΛΥΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ ΤΟΥ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ	ΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΝΕΤΕ
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα αρνητικά)	Δεν προστέθηκαν ένα ή περισσότερα αντιδραστήρια ή προστέθηκαν σε λανθασμένη σειρά.	Ελέγξτε και πάλι την όλη διαδικασία. Ελέγξτε μήπως δεν έχει προστεθεί κάποιο αντιδραστήριο. Επαναλάβετε το τεστ.
	Το πλακίδιο δεν αντιδρά	Ελέγξτε τον κωδικό στον φάκελο του πλακιδίου (βλ. οδηγίες χρήσης σημείο 4 περί λανθασμένου κωδικού).
		Ελέγξτε αν υπάρχουν ίχνη υγρασίας στο πλακίδιο που δεν αντιδρά. (Η γέλη πυριτίας πρέπει να έχει χρώμα κίτρινο ώχρα). Επαναλάβετε το τεστ.
Κύκλος ανάλυσης άκυρος (όλα θετικά)	Μόλυνση του υποστρώματος	Πάρτε μία νέα ποσότητα υποστρώματος
	Ανεπαρκής έκπλυση	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά
	Λανθασμένη αναρρόφηση	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας.
	Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται με πολύ αργό ρυθμό	Να αποφεύγετε την ξήρανση του πλακιδίου μετά την έκπλυση. Προσθέστε αμέσως τα αντιδραστήρια
	Υπάρχουν φυσαλίδες αέρα	Να αποφεύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων

		κατά την αναρρόφηση.
	Η οπτική διαδρομή δεν είναι διαυγής	Ελέγξτε αν η φωτεινή πηγή είναι καθαρή. Καθαρίστε με ένα χαρτομάντιλο το πλακίδιο
Ανεπαρκής θερμοκρασία	Λανθασμένος ο χρόνος ή η θερμοκρασία της επώασης	Ελέγξτε τον θερμοστάτη και τον χρόνο επώασης.
		Ακολουθήστε πιστά τις οδηγίες χρήσης
	Η ποσότητα του υποστρώματος που έχει προστεθεί, δεν είναι αρκετή.	Ελέγξτε τη λειτουργία της πιπέτας

17. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
4. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).
5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1082 (1968).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO POR CAPTURA PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgM ANTI TOXOPLASMA GONDII EN SUERO HUMANO, COMO UNA AYUDA EN EL DIAGNÓSTICO DEL TOXOPLASMA.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

El *Toxoplasma gondii* es un protozoo ubicuo que causa infecciones en todas las especies de mamíferos. Estudios serológicos han mostrado que en los seres humanos un elevado porcentaje de la población adulta ha sido infectada por este parásito. La enfermedad es particularmente grave en pacientes inmunodeprimidos durante el embarazo, siendo transmitida por la madre al feto.

Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo antes el embarazo, cuando sea posible; aquellos individuos que no presenten inmunidad deben de ser controlados con análisis frecuentes para comprobar la sueroconversión. La diagnóstico serológica de Toxoplasmosis puede ser efectuada por medio de titulación de las IgM específicas en cuanto estos anticuerpos unidos con los síntomas clínicos tienen un considerable significado de diagnóstico.

3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La prueba sobre la titulación IgM anti *Toxoplasma* está fundada sobre el principio de la captura de estas inmunoglobulinas y successiva revelación de las específicas, disfrutando de su capacidad de unir un antígeno conjugado a peroxidasa. La captura se efectúa con anticuerpos monoclonales unidos en la fase sólida (pocillos de microtitulación). El antígeno está constituido por taquizóitos purificados, inactivados y sonificados marcados con peroxidasa unida a monoclonales específicos anti *Toxoplasma*.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.
- **Poner los reactivos a temperatura ambiente de su uso.**

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de anticuerpos humanos monoclonales anti-IgM humanos

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (M seguido por el número de lote) que sirve para su identificación; retirar el soporte y las tiras necesarias. Colocar las tiras no utilizadas en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y cerrar fuertemente.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1x1.6 mL

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT-OFF 1x2.5 mL

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título del anticuerpo.

Ag ANTÍGENO Polvo liofilizado x 6 frascos

Contenido: *Toxoplasma gondii* purificado en tampón fosfato conteniente líquido ascítico de ratón y lactosa.

Preparación: Reconstituir con el volumen de conjugado indicado en etiqueta, mezclando por inversión.

CONJ CONJUGADO 1x18 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0.05% y Bronidox 0.02%.

Preparación: Listo para su uso

El Inmunocomplejo debe prepararse unos 45 minutos antes de su uso.

CONTROL IgM - IgM CONTROL NEGATIVO (PF93900) 1 x 1.6 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Suero humano diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L, con BSA 1% y ázida sódica al 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Solución salina tamponada (PBS) concentrada 10 veces; contiene Brij al 0.5%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:10 con agua destilada con el fin de obtener el tampón de lavado listo para su uso. Si hay cristales presentes, disolverlos a 37°C antes de diluir.

SAMP DIL 2 DILUYENTE 2 (PF93611) 1x100 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Para la dilución de las muestras de suero.

Contenido: Solución de proteínas en tampón fosfato con ázida sódica 0.09% con adición de metilnaranja como colorante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Listo para su uso **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Contenido: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUCIÓN BLOQUEANTE (PF93602) 1x16 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Solución de H₂SO₄ 0.3 mol/L, lista para su uso.

CINTA ADHESIVA (2)

BOLSA DE PLÁSTICO (1)

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS

- Incubador a 37°C
- Lector de Microplacas (longitud de onda 450 o 450/620 nm, con linealidades hasta OD ≥ 2.000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable)
- Agua Destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 10, 100, 1000 µL de solución
- Guantes de un solo uso
- Cronómetro
- Solución de hipoclorito del sodio (5%)
- Envases para la colección de materiales potencialmente infecciosos
- Papel absorbente.

5. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C.

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la abertura y/o de la preparación

REACTIVO	CONDICIONES
MICROPLACA	5 SEMANAS 2/8°C bolso de plástico
SUEROS DE CONTROL	5 SEMANAS 2/8°C
CONJUGADO	5 SEMANAS 2/8°C
ANTÍGENO RECONSTITUIDO	15 días 2/8°C
SUBSTRATO	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C, 1 semana a 15/30°C en ambiente oscuro
DILUYENTE MUESTRAS	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C
TAMPÓN DE LAVADO	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30°C
SOLUCIÓN BLOQUEANTE	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C,

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Cuidado:

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en las pruebas aprobadas por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las prácticas de seguridad comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero y los reactivos se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, según disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral. Usar los guantes de un solo uso y la protección para los ojos al manejar las muestras y durante la prueba. Lavar las manos a fondo después de terminar el test.
2. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El tampón de lavado contiene detergentes
 - b) El conjugado contiene fenol
 - c) El sustrato es ácido
 - d) Los reactivos contienen Ázida Sódica (0.09%) que puede reaccionar con cobre y plomo y formar ázidas metálicas potencialmente explosivas.

Si cualquier reactivo entra en contacto con la piel u ojos, lavar con mucha agua.
3. Los aparatos no desechables se deben esterilizar después su uso. El método preferido es autoclavar durante 1h a 121°C; los materiales desechables deben ser autoclavados o incinerados.
4. El ácido sulfúrico contenido en la Solución Bloqueante y el ácido clorhídrico usado para limpiar la cristalería son corrosivos; utilizar estos materiales con cuidado. En caso de contacto con la piel u ojos, limpiar con mucha agua.
5. Los ácidos neutralizados y los otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El derrame de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada tendrá que ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1%, antes de que se continúe el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en derrames que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

1. Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso. Inmediatamente después del uso poner los reactivos a la temperatura de conservación recomendada. **Es importante trabajar a la temperatura correcta. Compruebe que el termostato no esté por debajo de 35°C ó por encima de 39°C.** Abrir el sobre que contiene las tiras al menos media hora después a temperatura ambiente.
2. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad. La contaminación microbiológica de los reactivos debe ser evitada ya que esta puede acortar la vida del producto y causar resultados erróneos.
3. No modificar el método, ni reemplazar los reactivos con los de otros fabricantes o de otros lotes, a no ser que esté específicamente indicado que el reactivo es intercambiable. No reducir los tiempos de incubación recomendados.
4. Lavar con ácido hidroc্লórico 2M todos los materiales de laboratorio que se utilizan en las pruebas y aclarar con agua destilada o desionizada.
5. No exponer los reactivos a fuerte iluminación ni a humos de hipoclorito durante la conservación o las fases de incubación.
6. Evitar que los pocillos se sequen durante el ensayo.
7. Evitar la contaminación cruzada entre reactivos. Es importante usar pipetas exclusivas para cada reactivo.
8. Evitar de tocar el borde del pocillo con el conjugado. No salpicar sobre las microplacas.
9. Las titulaciones inmunoenzimáticas de vez en cuando pueden presentar un particular efecto llamado "edge effect" ("efecto filo") que debe reducirse al mínimo aumentando el valor de la humedad durante las fases de la incubación. Las placas se deben cubrir con sus tapas y deben ser incubadas a 37°C en un baño de agua usando un soporte para placas, o un incubador. Alternativamente, incubar las placas en un analizador aprobado. Para más información consultar el manual de usuario del equipo. No utilizar incubadores de CO₂.
10. Asegurarse de que el fondo de la placa esté limpio y seco, y de que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de leer la placa.
11. Puede ser fuente de error el uso de muestras altamente hemolizadas, suero no coagulado en su totalidad, o muestras que presentan contaminación microbiana.
12. El uso del kit con equipos automáticos debe ser convalidado por el usuario.

13. Leer el manual de usuario de cada equipo y en especial si desea obtener información sobre los puntos siguientes:

- instalación y requisitos específicos
- principios operativos, instrucciones, precauciones y riesgos
- especificaciones del fabricante y rendimiento del equipo
- mantenimiento y servicio técnico

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

El tipo de muestra es suero recogido normalmente de sangre venosa y manipulado con las apropiadas precauciones requeridas en la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar durante 4 días a 2/8°C. Para conservaciones más largas congelar a -20°C. Se puede descongelar un máximo de 3 veces. Las muestras no deben ser almacenadas en congeladores autodescongelantes. Agitar con cuidado las muestras descongeladas antes de la titulación. La inactivación al calor puede proveer resultados erróneos. La calidad de la muestra puede ser seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictéricas, hemolizadas o contaminadas.

El test no se puede aplicar a plasma humano.

8. PROCEDIMIENTO

- Preparar el número requerido de tiras.
- Preparar el tampón de lavado diluyendo el Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparar el antígeno reconstituyendo el liófilo con el conjugado (volumen indicado en etiqueta).

Diluir las muestras 1:101 poniendo 10 µL de suero en 1 mL de diluyente, dispensar 100 µL de cada muestra diluida para cada pocillo (se recomienda efectuar una doble prueba). Colocar los controles SIN DILUIR en una tira (100 µL para cada pocillo). El requisito mínimo indispensable es 1 negativo, 2 cut-off y 1 positivo. Dejar un pocillo libre para efectuar el blanco, utilizando sólo 100 µL de la mezcla sustrato.

Cubrir los pocillos con la cinta protectora e incubar 45 minutos a 37°C. Lavar 4 veces, dejando la solución de lavado en el pocillo 30 segundos cada ciclo (300 µL). Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo (antígeno/anticuerpos monoclonales anti Toxoplasma marcados con Peroxidasa) e incubar de nuevo 45 minutos a 37°C, cubriendo los pozos con la cinta protectora.. Lavar la placa otra vez 4 veces, como se describió anteriormente. Finalmente distribuir el Substrato, 100 µL/pozo. Después de 15 minutos a temperatura ambiente parar la reacción enzimática con 100 µL de Solución Bloqueante. Leer la Absorbancia (D.O.) a 450 nm o 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL TEST
--

STEP 1 Poner 100 µL de la muestra diluida/ calibradores en los pocillos.

-
- Incubar 45 min. a 37°C
-
- Lavar 4 veces (300 µl)
-

STEP 2 Añadir 100 µL de inmunocomplejo a cada pocillo

-
- Incubar 45 min. a 37°C
-
- Lavar 4 veces (300 µl)
-

STEP 3 Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo

-
- Incubar 15 min. a T.A.
-

STEP 4 Añadir 100 µL de Solución Bloqueante

-
- Leer la D.O. a 450 nm dentro de 30 min

10. VALIDACIÓN DEL TEST

Restar el valor del blanco (≤ 0.100) a todas las otras lecturas. Los valores en D.O. del suero de control Cut-off deben estar dentro del 25% del valor medio si testado en triple prueba. Descartar cualquier valor anormal y recalcular la media. El Control Positivo debe tener D.O. de por lo menos 1.5 veces el valor del Cut-off. La relación entre Control Negativo y Cut-off debe ser ≤ 0.6 . La D.O. del Cut-off debe ser ≥ 0.200 a 450 nm y ≥ 0.160 a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

Resultados cualitativos

Si el valor de la absorbancia de la muestra es superior al Cut-off la muestra resulta positiva por la presencia de IgM específicas para el antígeno.

Calcular la relación entre el valor de D.O. de la muestra y lo del Cut-off (INDEX).

La muestra se considera:

Positiva: si la concentración es > 1.2 .

Dudosa: $\pm 20\%$ del cut-off.

Negativa: si la concentración es < 0.8 .

Si el resultado es dudoso, repetir el test. Si el resultado continua siendo dudoso, recoger una nueva muestra de sangre.

12. LIMITACIONES

El uso del método inmunoenzimático “por captura” excluye posibles respuestas no específicas. De todas formas los resultados de la titulación deben ser interpretados con cuidado y validados por medio de evaluaciones clínicas y ulteriores pruebas de diagnóstico. Sueros de pacientes en fase precoz o tardía de la enfermedad, podrían dar un resultado repetidas veces negativo cerca del valor del Cut-off. En estos casos se recomienda verificar el resultado, titulando una nueva muestra recogida 7-10 días después de la primera. Los resultados deben ser siempre interpretados junto con otros procedentes de la evaluación clínica y de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se analizaron 53 muestras de suero contenientes potenciales interferenti:

- Anticuerpos Antinucleo (ANA) (n=9)
- Factor Reumatóideo (n=6)
- Anticuerpos eterófilos (n=3)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubina (n=8)
- Trigliceridos (n=9)

En ningún caso se observaron interferencias.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica externa, se analizaron 357 muestras procedentes de la rutina y 68 procedentes de la seroteca. Las muestras se probaron en comparación con otro método inmunoenzimático comercial; los casos discrepantes fueron probados con el método IFA después de la absorbancia de los anticuerpos IgG (Test di Remington). Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

		REFERENCIA	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

El kit Enzywell tiene una sensibilidad del 98.4% y una especificidad del 98.9%.

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo

Muestra	Replicados	Media (OD)	CV%
Control positivo	12	0.949	7.0
Control Cut-Off	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Precisión realizada en ensayos distintos

Muestra	Media (Index)					Media	CV%
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5		
Control positivo	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Precisión en lotes

Muestra	Index			Media	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. GUÍA DE RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSIBLES FUENTES DE ERROR	PRUEBA U ACCIONES
Serie no valida (todos negativos)	Uno o más reactivos no han sido añadidos o han sido añadidos en secuencia errónea .	Controlar de nuevo el procedimiento Controlar si hay disoluciones que no se hayan utilizado.
	Placa no reactiva	Controlar el código del envase de la placa (ver punto 4 de la información técnica para el código correcto).
		Controlar la presencia de humedad en la placa no utilizada. (El gel de sílice debe ser amarillo pálido) Repetir el test.
Serie no válida (todos positivos)	Contaminación del sustrato	Recoger una nueva alícuota de sustrato.
	Lavado inadecuado	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
Escasa precisión	Aspiración incompleta de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Aspiración inadecuada de los pocillos	Asegurarse del buen funcionamiento del lavador
	Error de pipeteado	Controlar el funcionamiento de la pipeta
	Adición de los reactivos demasiado lenta	Evitar la sequedad de la placa después del lavado. Añadir los reactivos inmediatamente.
	Presencia de burbujas	Evitar la formación de burbujas mientras se pipetea
	Sistema óptico no limpio	Controlar la fuente de luz y el detector para la presencia de suciedad . Limpiar el fondo de la placa con papel suave.
Desarrollo escaso del color	Tiempo o temperatura de incubación incorrectos	Verificar el control de la temperatura y el tiempo de incubación.
		Seguir cuidadosamente las instrucciones.
	Volumen inadecuado de sustrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFIA

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).

4. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 83: 196 (1985).
5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 41: 1082 (1968).



INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Français)

1. UTILISATION

METHODE IMMUNOENZYMATIQUE A CAPTURE POUR LA DETERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgM ANTI-TOXOPLASMA GONDII DANS LE SERUM HUMAIN.

2. INTERET CLINIQUE

Le *Toxoplasma gondii* est un protozoaire ubiquiste ayant la capacité d'infecter tous les espèces de mammifères. Chez l'homme, les études sérologiques ont démontré qu'une grande proportion de la population adulte a été infectée par ce parasite. La maladie peut être grave, particulièrement chez les patientes immunodéprimées pendant la grossesse, puisque le parasite peut être transmis au fœtus par la mère.

C'est la raison pour laquelle il est très important de connaître le titre d'anticorps au début de la gestation, pour pouvoir contrôler fréquemment si la séroconversion a lieu chez les patientes sans immunité. Le diagnostic sérologique de la toxoplasmose peut être effectué en titrant les IgM spécifiques, puisque ces anticorps, associés avec les symptômes cliniques, ont une grande valeur diagnostique.

3. PRINCIPE

Le test pour le dosage des IgM anti-toxoplasmose est basé sur le principe de la capture de ces immunoglobulines et leur détermination, en exploitant leur capacité de lier un antigène conjugué à la peroxydase. La capture se réalise en utilisant des anticorps monoclonaux liés à la phase solide (puits sur la plaque). L'antigène se constitue de tachizoites purifiés, inactifs et marqués avec la peroxydase liée aux anticorps monoclonaux spécifiques anti-Toxoplasme.

4. CONTENU DU KIT ET PREPARATION DES REACTIFS

- Le kit permet de réaliser 96 réactions.
- **Porter les réactifs à température ambiante avant l'utilisation.**

MT PLATE MICROPLAQUE 12 x 8 puits sensibilisés avec des anticorps monoclonaux anti-IgM humaines

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (M, suivi par le numéro du lot) qui sert à son identification. Sortir le support et les barrettes nécessaires du papier d'emballage et placer les barrettes non utilisées dans le sachet en plastique avec le gel de silice. Chasser l'air du sachet et le fermer en exerçant une pression sur la fermeture.

CONTROL + CONTROLE POSITIF 1x1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1x2.5 mL

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/l avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

Couleur : la couleur dépend du titre en anticorps.

Ag ANTIGENE lyophilisé x 6 flacons.

Composition : *Toxoplasma gondii* purifié, en tampon phosphate contenant du liquide ascitique de souris et du lactose.

Préparation : Reconstituer avec le volume de conjugué indiqué sur l'étiquette et agiter en renversant.

CONJ CONJUGUE 1x18 mL

Composition : Anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase, dans un tampon phosphate contenant 0.05% de phénol et 0.02% de bronidox.

Préparation : Prêt à l'emploi.

L'immunocomplexe doit être préparé 45 minutes avant l'emploi.

CONTROL IgM - CONTROLE NEGATIF IgM (PF93900) 1 x 1.6 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Sérum humain dilué dans un tampon phosphate à 0.01 mol/L avec 1% de BSA et 0.09% d'azide de sodium. Il se présente sous une forme liquide et il est prêt à l'emploi sans autre dilution.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1x100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Solution saline tamponnée, concentrée 10 fois ; contient 0.5% de Brij.

Préparation : Diluer à 1/10 avec de l'eau distillée pour obtenir un tampon de lavage prêt à l'emploi.

En présence de cristaux : chauffer la solution à 37 °C pour les solubiliser, puis réaliser la dilution.

SAMP DIL 2 DILUANT 2 (PF93611) 1x100 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique, additionnée d'azide de sodium 0.09% et de méthylorange en guise de colorant.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1x12 mL Prêt à l'emploi. **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Tétraméthylbenzidine à 0.26 mg/ml et H₂O₂ à 0.01% stabilisé dans un tampon citrate à 0.05 mol/l (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1x16 mL **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : H₂SO₄ à 0.3 mol/l en solution prête à l'emploi.

SACHET EN POLYETHYLENE (1)

FEUILLES ADHESIVES (2)

MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Incubateur à 37°
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à ≥ 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 µl
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette capable de prélever 10,100,1000 µl de solution
- Gants à jeter
- Compte-minutes
- Solution 5% de sodium hypochlorite
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectieux
- Papier absorbant

5. MODALITES DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

Conserver les réactifs à 2-8°C.

La date de péremption est imprimée sur chaque flacon et sur l'étiquette apposée sur la confection.

Les réactifs ont une stabilité limitée après l'ouverture et/ou la préparation.

REACTIF	CONDITIONS
MICROPLAQUE	5 semaines à 2/8°C, sachet en polythène.
CONTROLES	5 semaines à 2/8°C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8°C.
ANTIGENE RECONSTITUE	15 jours à 2/8°C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8°C, 1 semaine à 15/30°C, dans l'obscurité.
DILUANT	jusqu'à péremption à 2/8°C.
TAMPON DE LAVAGE	prêt à l'emploi 2 semaines à 2/8°C, 5 jours à 15/30°C.
SOLUTION D'ARRET	jusqu'à péremption à 2/8°C.

6. PRECAUTIONS D'UTILISATION POUR DIAGNOSTIC IN VITRO.

Attention :

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine. Bien que tous les produits d'origine humaine aient subi un contrôle de dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, les anticorps anti-VHC et l'Ag HBs en utilisant des méthodes approuvées par la FDA, ils doivent cependant être maniés comme étant des produits potentiellement infectieux.

Elimination des résidus: les échantillons de serum et les réactifs usages doivent être traités comme des déchets infectés, et donc éliminés conformément aux dispositions de loi en vigueur.

Précautions et avertissements pour la sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche. Porter des gants à jeter et des protections pour les yeux quand on manie des échantillons et pendant le test. Se laver soigneusement les mains une fois que le test est terminé.
2. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations de substances nocives ou irritantes :
 - a) Le tampon de lavage contient des détergents
 - b) Le conjugué et les contrôles contiennent du phénol
 - c) Le substrat est acide.
 - d) Le sérum de contrôle contient 0.09 % d'azide de sodium en guise de conservateur. Les azides peuvent réagir avec les métaux des canalisations et donner ainsi naissance à des composés explosifs.
 En cas de contact d'un réactif avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
3. Les instruments que ne sont pas à jeter doivent être stérilisés après l'emploi, de préférence en autoclave pendant 1 h à 121 °C. Les matériaux à jeter doivent être mis en autoclave ou incinérés.
4. L'acide sulfurique contenu dans la solution d'arrêt et l'acide chlorhydrique utilisé pour laver la verrerie sont corrosifs ; ces substances doivent être utilisées avec prudence. En cas de contact avec la peau ou les yeux, les laver à grande eau.
5. Les matériaux liquides à jeter, neutralisés avec une solution alcaline, doivent être désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 1% au moins. Une exposition à l'hypochlorite de sodium 1% pendant 30 minutes suffit pour garantir une désinfection efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectieux, essuyer immédiatement avec du papier absorbant et nettoyer le plan de travail avec, par exemple, de l'hypochlorure de sodium 1%, avant de continuer le test. En présence d'un acide, on pourra utiliser l'hypochlorite de sodium seulement après avoir essuyé la zone. Tous les matériaux utilisés pour nettoyer un renversement accidentel doivent être éliminés comme étant potentiellement infectieux.

Avertissements analytiques

1. Porter tous les réactifs et les échantillons à la température ambiante (18-30 °C) avant l'emploi. Remettre les réactifs à la température de conservation immédiatement après l'emploi. Il est très important de contrôler la température d'incubation des microplaques. Le thermostat ne doit pas descendre au dessous de 35 °C ni au dessus de 39 °C. Ouvrir le sachet contenant les barrettes après l'avoir laissé 30 minutes à la température ambiante.
2. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption. Eviter la contamination microbienne des réactifs parce que la validité peut se réduire et que les résultats peuvent être erronés.
3. Ne pas changer le procédé, ni remplacer les réactifs avec ceux d'autres producteurs ou d'autres lots, à moins qu'il ne soit précisé que le réactif est interchangeable parmi différents lots. Les temps d'incubation ne doivent pas être réduits.
4. Toute la verrerie utilisée pour le test doit être lavée soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (2M) et rincée à l'eau distillée ou désionisée.
5. N'exposer les réactifs ni à une forte lumière, ni aux vapeurs d'hypochlorure pendant leur conservation ou pendant les phases d'incubation.
6. Eviter le dessèchement des puits pendant le test.
7. Eviter la contamination croisée entre les réactifs. Il est important d'utiliser des pipettes « dédiées ».
8. Eviter de toucher ou d'éclabousser le bord du puits avec le conjugué. Ne pas souffler sur les microplaques.
9. Les dosages immunoenzymatiques présentent parfois un « effet de bord » (« edge effect ») ; cet effet peut être minimisé en augmentant l'humidité pendant les phases d'incubation. Les microplaques doivent être couvertes avec le couvre-plaque et incubées à 37 °C ou au bain-marie. Autrement, on peut faire incuber les plaques dans une analyseur approprié. Ne pas utiliser d'incubateurs à CO₂.
10. Avant de lire la microplaque, veiller à ce que le fond de la microplaque soit propre et sec et qu'il n'y ait aucune bulle d'air à la surface du liquide.
11. Des échantillons fortement hémolysés, du sérum non complètement coagulé, ou des échantillons présentant une contamination microbienne peuvent entraîner des résultats erronés.
12. L'utilisation du kit avec des instruments automatiques doit être validée par l'utilisateur.
13. Lire attentivement les modes d'emploi des instruments utilisés ; en particulier, il faut prêter attention :
 - à l'installation et aux avertissements spécifiques
 - aux principes opérationnels, aux instructions, précautions, risques
 - aux spécifications du producteur et aux performances de l'instrument
 - à la maintenance et à l'assistance technique

7. ECHANTILLONS ET LEUR CONSERVATION

Les sérums frais ou décongelés peuvent être utilisés. Les échantillons peuvent être stockés à +2-+8 °C pendant 4 jours. Pour un stockage plus long, congeler les sérums à – 20°C. Peut subir jusqu'à un maximum de trois décongelations. Éviter l'utilisation de l'espace de congélateur à dégivrage automatique pour le stockage des échantillons. Les sérums décongelés doivent être bien agités avant l'utilisation. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés. Les échantillons qui présentent une contamination microbienne peuvent fausser les résultats. Ceux qui sont fortement lipémiques, ictériques ou contaminés ne doivent pas être utilisés.

L'échantillon ne peut pas se constituer de plasma humain.

8. PROCEDURE

- Préparer le nombre nécessaire de barrettes.
- Préparation de la solution tamponnée de lavage :
Diluer la solution **de lavage concentrée** (par exemple : 100 ml + 900 ml d'eau distillée).
- Préparation de l'antigène en reconstituant le lyophilisé avec le conjugué (volume reporté sur l'étiquette).

Diluer les échantillons 1 :101 en versant 10µl de sérum dans 1 mL de diluant ; distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué dans les puits (il est conseillé d'effectuer l'analyse en double). Mettre les contrôles NON dilués (100 µl/puits) dans une barrette. Le numéro minimum indispensable est 1 négatif et positif et 2 cut-off. Utiliser un puits pour effectuer le blanc, en ajoutant seulement 100 µl de substrat par puits. Couvrir les puits avec la feuille de protection.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C. Laver pendant 30 secondes (300 µl), répéter la phase de lavage 4 fois. Ajouter 100 µl de l'immunocomplexe (antigène/anticorps monoclonaux marqués à la peroxydase) dans chaque puits.

Couvrir les puits avec la feuille de protection. Incuber pendant 45 minutes à 37°C. Laver la plaque encore 4 fois comme cela est mentionné précédemment. Distribuer le substrat (100 µl / puits). Incuber 15 minutes à température ambiante. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt. Lire la densité optique à 450 nm ou à 450/620 nm dans les 30 minutes.

9. SCHEMA D'ANALYSE

1e ETAPE Mettre 100 µl de sérum dilué/contrôles dans les puits de la barrette.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

2e ETAPE Mettre 100 µl de l'immunocomplexe dans les puits

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl).

3e ETAPE Mettre 100 µl de substrat dans les puits.

Incuber pendant 15 minutes à la température ambiante.

4e ETAPE Ajouter la solution d'arrêt, 100 µl dans chaque puits

Lire la densité optique à 450 nm dans les 30 minutes.

10. VALIDATION DU TEST - CONTROLE QUALITE

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.100). Calculer les valeurs du contrôle seuil analysé en triple. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus $\pm 25 \%$ de la valeur moyenne, sinon éliminer la valeur aberrante. Recalculer la moyenne.

Le contrôle positif doit avoir une D.O 1.5 fois supérieure à celle du sérum seuil. Le rapport entre la D.O du contrôle négatif et le sérum seuil doit être ≤ 0.6 . La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 0.200 à 450 nm et ≥ 0.160 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats qualitatifs

Si la valeur de l'O.D. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif en présence d'IgM spécifiques contre la toxoplasmose.

Calculer le rapport entre la valeur d'absorption de l'échantillon et celle du seuil (Index).

L'échantillon est considéré comme étant :

Positif : si le rapport est > 1.2

Incertain: si le rapport est compris 0.8 et 1.2
Négatif : si le rapport est > 0.8

Si le résultat est incertain, refaire le test. Si le résultat est de nouveau incertain, réaliser de nouveaux prélèvements d'échantillons de sang.

12. LIMITES DE LA METHODE

L'utilisation des méthodes « à capture » évite la possibilité de réponses non spécifiques. Cependant, les résultats doivent être utilisés en tenant compte des informations disponibles provenant de l'évaluation clinique et d'autres procédures diagnostiques.

Pendant la phase précoce ou tardive de la maladie, il est possible que des échantillons donnent une réponse plusieurs fois négative et proche de la valeur seuil. Dans ce cas, il est conseillé de vérifier le résultat, à travers un nouvel échantillon prélevé 7-10 jours après le 1er prélèvement. Le diagnostic ne doit pas se baser uniquement sur les résultats biologiques, mais il faut considérer l'ensemble des données cliniques.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

53 échantillons de sérum contenant des facteurs potentiellement interférents ont été testés.

- Anticorps anti-noyau (ANA) (n=9)
- Facteur rhumatoïde (n=6)
- Anticorps hétérophiles (n=3)
- Cytomégalovirus IgM (n=18)
- Bilirubine (n=8)
- Triglycérides (n=9)

Aucune interférence n'a été observée.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

Dans une expérimentation clinique, 357 sérums provenant de la routine et 68 provenant de la sérothèque ont été analysées, avec cette méthode et avec une autre méthode immunoenzymatique disponible dans le commerce. Ceux qui étaient discordants ont été analysés avec la technique IFA après l'absorbance des IgG (Test de Remington).

Les données de l'essai sont schématisées ci-après :

		REFERENCE	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

Sensibilité diagnostique: 98.4 %

Spécificité diagnostique: 98.9 %.

15. PRECISION

Précision dans la série

Echantillon	Répétitions	Moyen (OD)	CV%
Control positif	12	0.949	7.0
Control Cut-Off	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Précision entre séries

Echantillon	Moyen (Index)					Moyen	CV%
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5		
Control positif	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Précision entre lots

Echantillon	Index			Moyen	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. RESOLUTION DES PROBLEMES

PROBLEME	CAUSES POSSIBLES	ACTION/CONTROLE
Session non valable (tous négatifs)	Absence d'un ou de plusieurs réactifs, ou ajout des réactifs en ordre erroné	Contrôler le processus. Contrôler s'il y a une solution inutilisée. Refaire le test.
	Plaque non réactive	Contrôler le code imprimé sur le sachet de la plaque (lire les instructions pour l'emploi).
		Contrôler s'il y a de l'humidité sur la plaque inutilisée. (Le gel de silice doit présenter une couleur jaune pâle). Refaire le test.
Session non valable (tous positifs)	Contamination du substrat	Prélever une nouvelle quantité de substrat.
	Lavage insuffisant	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Erreur de pipetage	S'assurer que la pipette fonctionne correctement.
	Ajout des réactifs trop long	Eviter le dessèchement de la plaque après la phase de lavage. Ajouter immédiatement les réactifs.
	Présence de bulles d'air	Eviter la formation de bulles d'air pendant le pipetage.
	Parcours optique pas propre	Contrôler la source lumineuse et la présence d'impuretés. Essuyer le fond de la plaque avec du papier.
Développement insuffisant de la couleur	Temps ou température d'incubation non correct	Vérifier le contrôle de la température et du temps d'incubation
		Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
	Volume incorrect du substrat ajouté à la plaque	Contrôler le fonctionnement de la pipette.

17. REFERENCES

- G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
- F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
- J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).
- Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1082 (1968).



INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

ENZY-WELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Português)

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

MÉTODO IMUNO-ENZIMÁTICO DE CAPTURA PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS CLASSE IgM PARA TOXOPLASMA NO SORO HUMANO, COMO UMA AJUDA NO DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMA.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário ubíquo que provoca infecções em todas as espécies de mamíferos. No homem, estudos serológicos demonstraram que uma alta percentagem da população adulta foi infectada por este parasita. A doença é particularmente grave durante a gravidez, sendo transmitida de mãe para feto e provocando deformações sérias.

Por esta razão é importante determinar o grau de anticorpos antes do início da gravidez, se for possível; os sujeitos que não apresentarem imunidade devem ser seguidos com análises frequentes para determinar a seroconversão.

3. PRINCÍPIO DO TESTE

O teste para ensaio de IgM para *Toxoplasma* é baseado no princípio da captura destas imunoglobulinas e a subsequente identificação dos que são específicos, fazendo uso da habilidade para ligar um antígeno conjugado à peroxidase.

A captura é efectuada usando anticorpos monoclonais ligados à fase sólida (poços de microtitulação). O antígeno é composto de taquizoitos purificados, inactivados, tratados com som e marcados com peroxidase ligada a anticorpos monoclonais antitoxoplasma específicos.

4. CONTEÚDO DO KIT E PREPARAÇÃO DO REAGENTE

- Os reagentes são suficientes para 96 determinações.
- **Ponha à temperatura ambiente antes da utilização.**

MT PLATE MICROPLACA 12 x 8 poços cobertos com anticorpos monoclonais IgM anti-humanos

Utilização: abra a embalagem no lado oposto do código (M mais o número do lote), retire o suporte e as barras da embalagem folheada para serem usadas, e coloque as barras não usadas no saco de polietileno com gel de sílica, retire o ar e vede premindo o fecho.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1x1.6 mL

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com BSA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

CONTROL CUT-OFF CONTROLO DIRECTO 1x2.5 mL

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com BSA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

Cor: a cor dos calibradores é proporcional ao grau relativo de anticorpos.

Ag ANTIGÉNIO Pó seco-congelado x 6 frascos.

Conteúdo: Vírus purificado de *Toxoplasma gondii*, num tampão fosfatado com fluido ascítico de rato e lactose.

Preparação: reconstitua com volume conjugado mostrado na etiqueta, misturando por inversão.

CONJ CONJUGADO 1x18 mL

Conteúdo: anticorpos monoclonais marcados com peroxidase, numa solução tampão fosfatada contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%.

Preparação: Prontos a usar.

O imunocomplexo deve ser preparado uns 45 min. antes de utilização.

CONTROL IgM - IgM CONTROLO NEGATIVO (PF93900) 1x1.6 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: O soro humano, num tampão fosfatado 0.01 mol/L com BSA 1% e azida de sódio 0.09% líquida, pronta para ser usada sem qualquer diluição adicional.

WASH BUF 10x TAMPÃO DE LAVAGEM 10X (PF93603) 1x100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tampão fosfatado salino (PBS), concentrado 10 vezes, contendo Brij 0.5%.

Preparação: diluir o volume requerido 1:10 com água destilada para obtenção do tampão de lavagem pronto a ser usado. Se houver cristais, devem ser dissolvidos a 37°C antes da diluição.

SAMP DIL 2 DILUENTE 2 (PF93611) 1x100 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Solução proteica em tampão fosfatado com azida de sódio a 0.09% adicionado de metil-orange como corante.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL Prontos a usar **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

Conteúdo: Tetrametilbenzidina a 0.26 mg/mL e peróxido de hidrogénio a 0.01% estabilizado num tampão de citrato a 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUÇÃO DE PARAGEM (PF93602) 1x16 mL **INTERMUTÁVEL ENTRE LOTES**

H₂SO₄ 0.3 mol/L, em solução pronta a ser usada.

PELÍCULAS ADESIVAS (2)

SACO DE POLIETILENO (1)

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Incubador a 37°C
- Leitor de microplacas (comprimento de onda 450 ou 450/620 nm, com uma linearidade até DO ≥ 2.000)
- Lavagem de microplacas (preferível) capaz de fornecer volumes entre 225-375 µl
- Água destilada ou desionizada
- Recipientes de vidro normais para laboratório: cilindros, tubos de teste etc.
- Micropipetas para colheita adequada de solução 10, 100, 1000 µl
- Luvas descartáveis
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio (5%)
- Recipientes para colheita de materiais potencialmente infecciosos
- Lenço absorvente.

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

Os reagentes devem ser mantidos a 2/8°C.

A data de validade está impressa em cada componente e na etiqueta da embalagem.

Os reagentes têm uma estabilidade limitada após abertura e/ou preparação

REAGENTE	CONDIÇÕES
MICROPLACA	5 semanas a 2/8°C, saco de polietileno
SOROS DE CONTROLO	5 semanas a 2/8°C
CONJUGADO	5 semanas a 2/8°C
ANTIGÉNIO RECONSTITUÍDO	15 dias a 2/8°C
SUBSTRATO	até à data de validade a 2/8°C, 1 semana a 15-30°C no escuro
DILUENTE DE AMOSTRAS	até à data de validade a 2/8°C
TAMPÃO PARA ENXAGUAR	2 semanas a 2/8°C, 5 dias a 15/30°C.
SOLUÇÃO DE PARAGEM	até à data de validade a 2/8°C

6. PRECAUÇÕES

PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO APENAS.

Cuidado:

Este kit contém materiais de origem humana que foram examinados e deram uma resposta negativa por métodos aprovados pela FDA à presença de HbsAg e de anticorpos anti-HIV1, anti-HIV2 e anti-HVC. Dado que nenhum teste de diagnóstico poderá dar uma leitura completa no que respeita a agentes infecciosos, todo o material de origem humana deve ser manuseado como potencialmente infeccioso. Todas as precauções

normalmente adoptadas na prática de laboratório devem ser seguidas quando manusear material de origem humana.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro e os reagentes utilizadas devem ser tratados como resíduos infecciosos e portanto, eliminados em conformidade com as disposições legais aplicáveis.

Informação de saúde e segurança

1. Não utilize a boca na pipetagem. Utilize luvas descartáveis e protecção para os olhos quando manusear amostras e executar o ensaio. Lave as mãos meticulosamente quando tiver acabado.
2. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substâncias nocivas ou irritantes.
 - a) O tampão para enxaguar contém detergentes
 - b) O conjugado contém fenol
 - c) O substracto é ácido
 - d) Os controlos contêm azida de sódio (0.09%) que pode reagir com chumbo e cobre nos canos e formar depósitos altamente explosivos de azidas metálicas.
 Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
3. Aparelhos não descartáveis devem ser esterilizados após a utilização. O método preferido é a autoclave para 1 hora a 121°C; os descartáveis devem ser colocados em autoclave ou incinerados.
4. O ácido sulfúrico necessário para a solução de paragem e ácido hidrolórico usado na lavagem de recipientes de vidros são corrosivos e devem ser manuseados com cuidado apropriado. Se algum dos reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lave a área profusamente com água.
5. Ácidos neutralizados e outros líquidos dispensáveis devem ser descontaminados juntando um volume suficiente de hipoclorito de sódio para obter uma concentração final de pelo menos 1%. Uma exposição de 30 minutos a hipoclorito de sódio a 1% pode ser necessária para assegurar uma descontaminação efectiva.
6. Salpicos de materiais potencialmente infecciosos devem ser removidos imediatamente com lenço de papel absorvente e a área contaminada esfregada com hipoclorito de sódio a 1%, por exemplo, antes de o trabalho continuar. O hipoclorito de sódio não deve ser usado com salpicos que contenham ácidos, excepto se a área salpicada for primeiro seca. Os materiais usados para limpar salpicos, incluindo as luvas, devem ser descartados como lixo biológico potencialmente perigoso. Não coloque em autoclave materiais que contenham hipoclorito de sódio.

Precauções analíticas

1. Aguarde que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18-30°C) antes da utilização. Reponha imediatamente os reagentes à temperatura recomendada para armazenamento após utilização. **É importante trabalhar à temperatura correcta. Verifique se o termostato não desce abaixo de 35°C ou acima de 39°C.** Abra o envelope que contém as tiras após cerca de 30 minutos à temperatura ambiente, no mínimo.
2. Não utilize reagentes além da data de validade anunciada. Contaminação microbiológica de reagentes deve ser evitada, dado que poderá reduzir a duração do produto e provocar resultados errados.
3. Não modifique o procedimento de teste ou substitua reagentes por outros de outros fabricantes ou outros lotes de reagente a menos que sejam estipulados como intermutáveis. Não reduza nenhum dos tempos recomendados para incubação.
4. Qualquer recipiente de vidro a ser usado com os reagentes deve ser lavado profusamente com ácido hidrolórico 2M e depois enxaguado com água destilada ou água desionizada de alta qualidade.
5. Não exponha reagentes a luz intensa ou a vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou durante os passos de incubação.
6. Não deixe que os poços sequem durante o procedimento de ensaio.
7. Deve-se ter cuidado para não haver contaminação cruzada entre reagentes. É importante que as pipetas sejam dedicadas a uso exclusivo com os vários reagentes.
8. Deve ser tomado cuidado para evitar tocar ou salpicar a borda do poço com o conjugado. Não “assopre” as microplacas.
9. Os ensaios de imuno-enzimas podem exibir ocasionalmente um "efeito de margem" que deve ser minimizado aumentando a humidade durante os passos de incubação. As placas devem ser cobertas com as suas tampas e incubadas a 37°C tanto num banho de água com suporte flutuante ou para rack para suportar as placas se for necessário, ou num incubador. Alternativamente, as placas podem ser incubadas num analisador aprovado. Veja o manual de instruções apropriado para mais detalhes. Os incubadores de CO₂ não devem ser utilizados.
10. Assegure-se que a parte inferior da placa está limpa e seca, e que nenhuma bolha está presente na superfície do líquido antes de a ler.
11. A utilização de amostras altamente hemolisadas, soros incompletamente coagulados, ou amostras com contaminação microbiana pode dar resultados erróneos.
12. O uso do kit com instrumentos automáticos deve ser validado por o usuário.

13. Para cada instrumento utilizado, leia o manual de instruções do fabricante cuidadosamente para obter informação adicional sobre os seguintes pontos:
- instalação e requisitos particulares
 - princípios de operação, instruções, precauções e riscos
 - especificações do fabricante e desempenho dos instrumentos
 - manutenção e reparação

7. TIPO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

A amostra é composta de soro recolhido de maneira normal numa veia e manuseado com todas as precauções por boas práticas laboratoriais. O soro fresco pode ser guardado durante 4 dias a 2/8°C, ou congelado por períodos mais longos a -20°C, e pode ser descongelado um máximo de três vezes. Evite a utilização de congeladores autodescongeláveis para armazenamento de amostras. Amostras descongeladas devem ser cuidadosamente misturadas antes de efectuar o teste. Inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade da amostra pode ser seriamente afectada por contaminação microbiana que leve a resultados erróneos.

Amostras fortemente lipémicas, contaminadas ou ictéricas devem ser evitadas.

O teste não é aplicável ao plasma humano.

8. PROCEDIMENTO DE TESTE

- Prepare a quantidade necessária de tiras
- Prepare o tampão de lavagem diluindo o Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare o antigénio reconstituindo o conjugado com o antigénio (volume relatado na etiqueta).

Amostras diluídas 1:101 distribuindo 10 µL de soro em 1mL de diluente. Coloque 100 µL de cada amostra diluída por poço (testes duplicados são recomendados). Coloque calibradores NÃO DILUÍDOS numa tira (100 µL em cada poço). O requisito mínimo é 1 controlo negativo, 2 de corte e um positivo. Deixe um poço para a nula, executando com a utilização de 100 µL de mistura de substrato.

Os poços são cobertos com filme protector e incubados durante 45 minutos a 37°C. Depois de lavar quatro vezes durante 30 segundos (300 µl), junte 100 µL de imunocomplexo (Antigénio/ anticorpos monoclonais anti-Toxoplasma gondii marcados com peroxidase) a cada poço e deixe incubar mais uma vez durante 45 minutos a 37°C, cobrindo os poços com filme protector. A placa é lavada mais quatro vezes, como está descrito acima. Finalmente, o substrato é distribuído, 100 µL/poço.

Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reacção enzimática é parada com 100 µL de solução de paragem.

A adsorção (D.O.) é lida a 450 nm ou 450/620 nm dentro de 30 min.

9. ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE TESTE
--

PASSO 1 Coloque 100 µL de amostra diluída/ controlos nos poços das tiras.

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes (300 µl)

PASSO 2 Junte 100 µL de imunocomplexo a cada poço

- Incube durante 45 minutos a 37°C
- Lave quatro vezes. (300 µl)

PASSO 3 Junte 100 µL de substrato a cada poço

- Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente

PASSO 4 Adicione 100 µl de solução de paragem.

- Leia a adsorção a 450 nm dentro de 30 min.

10. VALIDAÇÃO DO TESTE

Subtraia o valor do nulo (≤ 0.100) de todas as outras leituras. Os valores D.O. do soro de controlo de corte quando forem testados em triplicado devem estar dentro do valor médio de 25%. Ignore qualquer valor anormal e recalcule o médio. O controlo positivo deve ter uma D.O. de pelo menos 1.5 vezes a do soro de corte. A relação entre Controlo Negativo e de Corte deve ser ≤ 0.6 . O valor de D.O. do directo deve ser ≥ 0.200 a 450 nm e ≥ 0.160 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados qualitativos

Se a adsorção da amostra for maior que a de controle, a amostra é positiva para a presença de IgM específico. Calcule a relação entre o valor DO da amostra e a do valor de corte (ÍNDICE).

A amostra é considerada:

Positiva: se a relação for > 1.2 .

Duvidosa: $\pm 20\%$ do valor de corte.

Negativa: se a relação for < 0.8 .

Se o resultado for duvidoso, repita o teste. Se permanecer duvidoso, recolha uma nova amostra de soro.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

A utilização do método de “captura” mono-enzimático evita respostas possíveis não-específicas. No entanto, os resultados devem ser usados em conjunção com a informação disponível na avaliação do historial clínico ou em procedimentos de diagnóstico.

Podem ser observadas em pacientes num estadio cedo ou tardio da doença amostras que dão um resultado negativo repetido perto do valor de corte. Nestes casos, a confirmação do resultado é recomendada, testando uma nova amostra retirada do mesmo paciente num intervalo de 7 a 10 dias desde a primeira amostra. Os resultados devem ser interpretados sempre com a avaliação da imagem clínica e de outros dados de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 53 amostras de soro contendo substâncias potencialmente interferentes:

- Anticorpos antinucleares (ANA) (n=9)
- Factor reumatóide (n=6)
- Anticorpos heterófilos (n=3)
- Citomegalovírus IgM (n=18)
- Bilirrubina (n=8)
- Triglicéridos (n=9).

Nenhuma interferência foi notada em qualquer caso.

14. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO DIAGNÓSTICO

Num teste clínico executado num laboratório de hospital, 357 amostras da prática de rotina e 68 da colheita de soro foram analisadas pelo kit presente em paralelo com outros kits imuno-enzimáticos comerciais. Todas as amostras discordantes foram analisadas pela técnica IFA após a absorção de IgG (teste de Remington).

Os resultados são indicados na tabela seguinte:

		REFERÊNCIA	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

O kit Enzy-Well tem uma sensibilidade de 98.4% e uma especificidade de 98.9%.

15. PRECISÃO

Precisão intrínseca

Amostra	Replicações	Média (OD)	CV%
Controlo positivo	12	0.949	7.0
Controlo Cut-Off	10	0.277	11.6
TXM 1	24	0.205	4.9
TXM 2	24	0.562	6.2
TXM 3	24	1.423	6.1

Precisão entre-ensaios

Amostra	Média (Index)					Média	CV%
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5		
Controlo positivo	3.6	3.4	3.9	3.6	4.2	3.7	8.4
TXM 1	0.5	0.5	-	0.5	0.7	0.6	16.7
TXM 2	1.5	1.8	1.7	1.6	1.9	1.7	9.4
TXM 3	3.8	4.8	4.4	4.2	4.9	4.4	10.2

Precisão entre lotes

Amostra	Index			Média	CV%
	Lot 159	Lot 160	Lot 161		
TXM 1	0.4	0.5	0.5	0.5	12.0
TXM 2	1.8	1.5	1.6	1.6	7.5
TXM 3	3.0	3.7	4.3	3.7	17.1

16. RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	POSSÍVEIS CAUSAS	TESTE OU ACÇÃO
Passagem inválida (todos negativos)	Um ou mais reagentes não foram adicionados ou estão na sequência incorrecta	Verifique o procedimento Verifique se existem soluções não usadas. Repita o teste
	Placa não reactiva	Verifique o código na embalagem que contém a placa (ver o código correcto no anexo da embalagem).
		Verifique a existência de humidade na placa não utilizada. (O dissecante de gel de sílica deve estar amarelo pálido). Repita o teste
Passagem inválida (todos positivos)	Contaminação do substrato	Obtenha nova aliquota de substrato.
	Lavagem inadequada	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
Pouca precisão	Lavagem incompleto dos poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Aspiração inadequada de poços	Assegure-se que o aparelho de lavagem funciona bem
	Erro de pipetagem	Verifique a função de pipetagem
	A adição de reagente é muito lenta	Evite a secagem da placa após o passo de lavagem. Adicione os reagentes imediatamente
	Presença de bolhas	Evite bolhas de ar durante a pipetagem.
	A passagem óptica não está limpa	Verifique se o instrumento luminoso e o detector têm sujidade. Limpe a parte inferior da placa com um pano suave.
Desenvolvimento inadequado de cor.	Tempos ou temperatura de incubação inadequados	Verifique o controlo de temperatura e a monitorização do tempo.
		Observe as instruções recomendadas de utilização.
	Volume inadequado do substrato adicionado à placa	Verifique a função de pipetagem

17. REFERÊNCIAS

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: 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 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuijsen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
4. J. Fung, A. Zieglermaier et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).

5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* 41: 1082 (1968).

	EN ES IT	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione	FR GR PT	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico
	EN ES IT	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro	FR GR PT	Utiliser jusqu'e Ημερομηνία λήξης Prazo de validade
	EN ES IT	Caution,consult accompanying documents Atención,ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída
	EN ES IT	Manufacturer Fabricante Fabbicante	FR GR PT	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante
	EN ES IT	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi	FR GR PT	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις Conteúdo suficiente para “n” ensaios
	EN ES IT	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura	FR GR PT	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura
	EN ES IT	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso	FR GR PT	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização
	EN ES IT	Biological risks Riesgo biológico Rischio biologico	FR GR PT	Risques biologiques Βιολογικοί κίνδυνοι Risco biológico
	EN ES IT	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo	FR GR PT	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo
	EN ES IT	In Vitro Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro	FR GR PT	Dispositif médical de diagnostic in vitro In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	EN ES IT	Batch code Código de lote Codice del lotto	FR GR PT	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote

CE
0123

DIESSE Diagnostica Senese S.p.A
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577 587111