



ENZYWELL

TOXOPLASMA IgA

REF 91043 (96 tests)

Prodotto da/Manufactured by/ Κατασκευάζεται από/
Fabricado por/ Fabriqué par:
DIESSE Diagnostica Senese
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX / ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / INDICE / SOMMAIRE / CONTEÚDO

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



ISTRUZIONI PER L'USO

**ENZYWELL
TOXOPLASMA IgA**
REF 91043

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgA ANTI TOXOPLASMA GONDII NEL SIERO UMANO.

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 durante la gestazione in quanto viene trasmessa dalla madre al feto provocando gravi malformazioni.

Per quest'ultimo motivo è importante conoscere il titolo anticorpale all'inizio della gravidanza e nei soggetti non immuni controllare con frequenti analisi se si verifica sieroconversione. Il dosaggio delle IgA risulta particolarmente utile per stabilire sierologicamente la fase acuta della malattia.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

L'antigene da *Toxoplasma gondii* purificato ed inattivato viene legato alla fase solida (strip di pozzetti 1x8). Per incubazione con siero umano diluito le immunoglobuline specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgA umane marcati con perossidasi.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.

- **Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE MICROPIASTRA 12 x 8 pozzetti sensibilizzate con *Toxoplasma gondii*.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta al codice (T seguita dal numero di lotto) che è utile 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 contenente un alto titolo di anticorpi IgA anti *Toxoplasma g.* 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 mL

Contenuto: Siero umano contenente un basso titolo di anticorpi IgA anti *Toxoplasma g.* 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.

CONJ CONIUGATO 1 x 16 mL

Contenuto: una soluzione di anticorpi monoclonali anti IgA umane marcati con perossidasi in tampone fosfato con fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%. Pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

IgA CONTROL - IgA CONTROLLO NEGATIVO 1 x 1.6 mL

Contenuto: Siero umano in tampone fosfato 0.01 mol/L contenente 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUENTE 50X (PF93703) 1 x 4.5 mL

Contenuto: Soluzione proteica concentrata 50x, con anticorpi monoclonali anti-IgG umane, fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:50 nel tampone di lavaggio per avere il diluente pronto all'uso.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Pronto all'uso.

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 **INTERCAMBIABILE FRA LOTTI**

Soluzione di H₂SO₄ 0,3 mol/L pronta all'uso.

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO 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 da 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
SIERI DI CONTROLLO	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C; conservare al buio
IgA DILUENTE CAMPIONI	p.uso 2 settimane 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 ED AVVERTENZE

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. CONSERVARE A 2-8°C

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 1 h 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 automatizzati deve essere validato da parte dell'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 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 al plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare il diluente dei campioni aggiungendo l'IgA DILUENT 50x al tampone di lavaggio (0.5 mL per 25 mL).

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 (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 del coniugato 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 a 450/620 nm entro 30 min.

9. SCHEMA DEL SAGGIO

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

incubare 45 min. a 37°C

lavare 4 volte (300 µL) |
| STEP 2 | Mettere 100 µL di coniugato 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 (≤ 0.150) 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 testato in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il valore del Cut-off deve essere almeno 0.2 di O.D. 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 D.O. del cut-off deve essere $\geq 0,2$ a 450 nm e $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

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 (Index) è > 1.2 .

Dubbio: = quando il rapporto (Index) $\pm 20\%$ del Cut-Off.

Negativo: quando il rapporto(Index) è < 0.8 .

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il livello delle IgM anti-Toxoplasma può essere determinato usando il kit Toxoplasma IgM. Alternativamente, si analizzerà un secondo campione prelevato 8-14 giorni più tardi, per verificare un eventuale aumento delle IgA. Il risultato del test deve essere comunque valutato insieme a dati provenienti da altre procedure diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Campioni contenenti potenziali interferenti quali il Fattore reumatoide possono alterare le prestazioni del test. Campioni di donne in stato gravidanza reattive per anticorpi IgG anti Toxoplasma e non reattive per anticorpi IgM specifici non interferiscono nel test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica, sono stati analizzati 135 campioni, di cui 29 appartenenti a soggetti con infezione acuta (IgM positivi) . I campioni sono stati analizzati con un altro metodo immunoenzimatico commerciale:.

I risultati sono qui di seguito riassunti:

	Altro metodo	
	POS	NEG
Diesse POS	27	2
NEG	2	104

La sensibilità e specificità diagnostica del metodo risultano essere rispettivamente 93% (78-98% IC al 95%) e 98% (93-99% IC al 95%)

15. PRECISIONE

Tab.1 Precisione nella prova (n=6)

Campione	D.O. media	D.S.	CV%
S1	0.112	0.01	9
S2	0.743	0.036	5
S3	1.307	0.056	4

Tab.2 Precisione tra prove e tra lotti (n=5)

Index	Media	CV%
Campione S1	0.3	26
Campione S2	2.1	24
Campione S3	3.8	9

16. GUIDA AI 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 istruzioni per l'uso punto 4 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	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. J. Husskinson, P. Stepick-Biek et al.: Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. 27: 2031 (1989).
2. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. A.M. Van Loon and J. Van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33: 635 (1980).
4. P. Stepick-Biek et al.: Contribution of specific serum IgA assay to the diagnosis of Toxoplasmosis. Ann. Pediatr. 34: 375 (1987).
5. E. Rigoli et al.: Determinazione e significato delle IgA anti-Toxoplasma gondii nell'identificazione della fase esordiente dell'infezione toxoplasmica. Microbiologia Medica 5: 95 (1990).



INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
TOXOPLASMA IgA**
REF 91043**(English)****1. INTENDED USE**

IMMUNOENZYMATIC KIT FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgA-CLASS ANTIBODIES AGAINST TOXOPLASMA GONDII IN HUMAN SERUM.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Toxoplasma gondii is a ubiquitous protozoa which causes infection in all species of mammals. In man, serological studies have shown that a high percentage of the adult population becomes infected by this parasite. The disease is particularly dangerous during pregnancy, being transmitted from mother to fetus and causing serious malformations. For this reason it is important to determine the antibody titer at the beginning of pregnancy; those subjects who do not present immunity should be followed up with frequent analyses to check for serum conversion (1). The assay of the IgA is of particular importance in establishing serologically the acute phase of the disease.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the ELISA technique (Enzyme linked Immunosorbent Assay) (2,3). The purified and inactivated Toxoplasma gondii antigen is bound to the solid phase (8-well strips). Following incubation with dilute human serum, the specific immunoglobulins are bound to the antigen. After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation with the conjugate, composed of human IgA monoclonal antibodies labelled with peroxidase, is performed. The unbound conjugate is eliminated and the peroxidase substrate is added. The colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the serum sample.

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

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

MT PLATE MICROPLATE 12x8 wells coated with Toxoplasma gondii.

Use: open the package at the opposite end from the code (T followed by the lot number) which is useful for identification purposes, 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, expell the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1x1.6 mL

Contents: Diluted human serum containing a high level of anti-Toxoplasma IgA antibodies, 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 of the controls is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT-OFF CUT OFF CONTROL 1x2 mL

Contents: Diluted human serum containing a low level of anti-Toxoplasma IgA antibodies 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 of the controls is proportional to the relative antibody titer.

CONJ CONJUGATE 1x16 mL

Contents: monoclonal antibodies anti-human IgA labelled with Peroxidase, in phosphate buffer with phenol 0.05% and Bronidox 0.02%. Ready for use without further dilution.

IgA CONTROL - IgA NEGATIVE CONTROL (PF93900) 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.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603) 1 x 100 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUENT 50X (PF93703) 1x4.5 mL For dilution of serum samples.

Contents: Proteic solution concentrated 50 times, with monoclonal antibodies anti-human IgG, phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Preparation: Dilute the required volume 1:50 in the washing buffer to obtain the diluent ready for use.

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 nm or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- 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
Control sera	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Substrate	up to the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C; store in the dark
IgA Sample Diluent	ready for use, 2 weeks at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	up to 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 0.9% 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 ½ hr 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 users.
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 shaken before performing 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 cannot be performed on human plasma.

8. TEST PROCEDURE

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (25 mL + 225 mL H₂O).
- Prepare the diluent for samples by adding Diluent 50x to the washing buffer (add 0.5 mL to 25 mL).

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 conjugate 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/reagent blank/controls to the wells of the strips.
--------	---

Incubate for 45 min. at 37°C

Wash 4 times (300 µL)

STEP 2	Add 100 µL of conjugate 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. QUALITY CONTROL VALUES

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum must be within 25% of the mean value if tested in triplicate. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The O.D. of the Cut-off must be at least 0.2. 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 O.D. of the cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 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 IgA.

Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off. The sample is considered:

Positive: if the ratio (Index) is > 1.2 .

Doubtful: if the ratio (Index) is $\pm 20\%$ of the Cut-Off.

Negative: if the ratio (Index) 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 Toxoplasma gondii IgM level should be determined using Toxoplasma IgM kit. Alternatively, a second serum sample obtained 8-14 days later, should be tested to determine an increase in the IgA antibody level.

The test result should be used in conjunction with information available from the evaluation of other diagnostic procedures.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

Samples containing potentially interfering substances such as Rheumatoid factor may alter the performance of the test. Samples from pregnant women which are reactive for IgG antibodies and non reactive for IgM antibodies anti-Toxoplasma, do not interfere in the test.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial, 135 samples were analyzed, 29 of which came from subjects with an acute infection (IgM positive). The samples were analyzed with another commercial immunoenzymatic method: the results are reported here below:

	Other method	
	POS	NEG
Diesse POS	27	2
NEG	2	104

The diagnostic sensitivity and specificity of the method are respectively 93% (78-98% IC at 95%) and 98% (93-99% IC at 95%)

15. PRECISION

Table 1 Precision "in run" (n=6)

Sample	Average O.D.	S.D.	CV%
S1	0.112	0.01	9
S2	0.743	0.036	5
S3	1.307	0.056	4

Table 2 Precision between runs (n=5)

Index	Average	CV%
Sample S1	0.3	26
Sample S2	2.1	24
Sample S3	3.8	9

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, point 4, 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. J. Husskinson, P. Stepick-Biek et al.: Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. 27: 2031 (1989).
1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. A.M. Van Loon and J. Van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33: 635 (1980).
4. P. Stepick-Biek et al.: Contribution of specific serum IgA assay to the diagnosis of Toxoplasmosis. Ann. Pediatr. 34: 375 (1987).
5. E. Rigoli et al.: Determinazione e significato delle IgA anti-Toxoplasma gondii nell'identificazione della fase esordiente dell'infezione toxoplasmica. Microbiologia Medica 5: 95 (1990).



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ENZYWELL

IgA ΤΟΞΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

REF 91043

(Ελληνικά)

1. ΥΠΟΔΕΙΚΝΥΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ IgA ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΤΟΞΟΠΛΑΣΜΑΤΟΣ GONDII ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Τοξόπλασμα 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 κατά την εγκυμοσύνη επειδή μεταδίδεται από την μητέρα στο έμβρυο και μπορεί να προκαλέσει ατελείς διαπλάσεις βαριάς μορφής.

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.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το τεστ βασίζεται στην μέθοδο ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay).

Το αντιγόνο, αποτελούμενο από Τοξόπλασμα gondii κεκαθαρισμένο και αδρανικοποιημένο, συνδέεται με τη στερεά φάση (ταινίες κυψελίδων 1x8). Μέσω επώασης με αραιωμένο ανθρώπινο ορό, οι ειδικές ανοσοσφαιρίνες συνδέονται με το αντιγόνο.

Μετά από εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται η επώαση με το συζυγές, που αποτελείται από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα IgA συζευγμένα με υπεροξειδάση ραφανιδίων.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης.

Το μπλε χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς την συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που βρίσκονται στον υπό εξέταση ορό. Όταν η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη διαλύματος θετικού οξέος, ο κίτρινος χρωματισμός, που θα προκύψει, μπορεί εύκολα να μετρηθεί σε έναν αναγνώστη μικροπλακιδίων ELISA.

4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Τα αντιδραστήρια καλύπτουν 96 τεστ.

- Φέρτε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν από τη χρήση

MT PLATE ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ 12 x 8 κυψελίδες ευαισθητοποιημένες με Toxoplasma gondii.

Χρήση: Ανοίξτε το περίβλημα των ταινιών από την αντίθετη πλευρά που αναγράφεται ο κωδικός (Τ ακολουθούμενο από τον αριθμό της παρτίδας) που χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της, πάρτε τη 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 με υψηλή περιεκτικότητα αντισωμάτων IgA κατά του Toxoplasma g 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 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός με χαμηλή περιεκτικότητα αντισωμάτων IgA κατά του Toxoplasma g 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.

CONJ ΣΥΖΥΓΤΕΣ 1 x 16 mL

Περιεχόμενο: διάλυμα από ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι IgA σεσημασμένα με υπεροξειδάση σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%. Έτοιμο για χρήση χωρίς επιπλέον αραίωση.

IgA CONTROL - ΟΡΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ IgA 1 x 1.6 mL

Περιεχόμενο: 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 αραίωση.

WASH BUF 10x ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ 10X (PF93603) 1 x 100 mL **ΚΟΙΝΟ ΣΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ ΠΑΡΤΙΔΕΣ**

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.

IgA SAMP DIL 50x IgA ΔΙΑΛΥΤΗΣ 50X (PF93703) 1 x 4.5 mL

Περιεχόμενο: Πρωτεϊνικό διάλυμα συμπυκνωμένο 50x, με ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-IgG, φαινόλη 0,05% και Bronidox 0,02%.

Προετοιμασία: Αραιώστε τον απαιτούμενο όγκο σε αναλογία 1:50 στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης για να παρασκευάσετε τον διαλύτη έτοιμο για χρήση.

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

Έτοιμο για χρήση.

Περιεχόμενο: Τετραμεθυλβενζιδίνη 0,26 mg/mL και H₂O₂ 0,01% σταθεροποιημένα σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ (PF93602) 1 x 16 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 και 405 nm, με γραμμικότητα μέχρι Ο.Π. >= 2,000)
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακιδίων (μη απαραίτητη) ικανότητας 225-375 μL
- 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 μL 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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ

ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟ

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

ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΣΥΖΥΓΕΣ

5 εβδομάδες στους 2/8°C

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

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

ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ IgA

έτοιμος για χρήση 2 εβδομάδες σε 2/8°C

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ

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

ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΗΣ

μέχρι τη λήξη του σε 2/8°C

6. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**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 σχηματίζει 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 1 h σε 121°C, ενώ το υλικό μίας χρήσης πρέπει να μπαίνει στον κλίβανο ή να αποτεφρώνεται.
10. Το θεϊκό 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 χέιλος 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 νωπός 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 τον διαλύτη δειγμάτων προσθέτοντας τον IgA DILUENT 50x στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (0.5 mL για 25 mL).

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 συζυγούς 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/τυφλού/ορού ελέγχου στις κυψελίδες της ταινίας

Επωάστε για 45 λεπτά στους 37°C

Κάνετε 4 εκπλύσεις (300 μl) |
| STEP 2 | Ρίξτε 100 μL συζυγούς 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 (≤ 0.150) 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. Η τιμή του Cut-off πρέπει να είναι τουλάχιστον το 0.2 της Ο.Π. Ο θετικός ορός ελέγχου πρέπει να έχει Ο.Π. τουλάχιστον 1.5 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 $\geq 0,2$ στα 450 nm και $\geq 0,16$ στα 450/620 nm..

11. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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 (Index) είναι > 1.2 .

Αμφίβολο: = όταν ο λόγος (Index) είναι $\pm 20\%$ του Cut-Off.

Αρνητικό: όταν ο λόγος (Index) είναι < 0.8 .

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

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

Ο προσδιορισμός των IgM κατά του Τοξοπλάσματος πρέπει να γίνει χρησιμοποιώντας το kit Toxoplasma IgM. Εναλλακτικά θα αναλυθεί ένα δεύτερο δείγμα που θα έχει συλλεχθεί 8-14 ημέρες μετά, για να εξακριβωθεί τυχόν αύξηση των IgA.

Σε κάθε περίπτωση το αποτέλεσμα του τεστ θα πρέπει να συνεκτιμηθεί με άλλα δεδομένα προερχόμενα από άλλες διαγνωστικές έρευνες.

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Οροί που περιέχουν δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες όπως ο Ρευματοειδής Παράγοντας, μπορεί να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα του τεστ.

Δείγματα εγκύων που αντιδρούν με τα αντισώματα IgG αντι-Τοξοπλάσματος και που δεν αντιδρούν με τα ειδικά αντισώματα IgM, δεν επηρεάζουν το τεστ.

14. ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Σε έναν κλινικό πειραματισμό αναλύθηκαν 135 δείγματα εκ των οποίων τα 29 προέρχονταν από ασθενείς με οξεία λοίμωξη (IgM θετικοί). Τα δείγματα αναλύθηκαν και με μίαν άλλη ανοσοενζυμική εμπορική μέθοδο. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω:

	Άλλη μέθοδος	
	POS	NEG
Diesse POS	27	2
NEG	2	104

Η ευαισθησία και η διαγνωστική ειδικότητα της μεθόδου είναι αντίστοιχα 93% (78-98% IC al 95%) και 98% (93-99% IC 95%)

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

Πίν.1 Ακρίβεια κατά την ανάλυση (n=6)

Δείγμα	M.T Ο.Π..	D.S.	CV%
S1	0.112	0.01	9
S2	0.743	0.036	5
S3	1.307	0.056	4

Πίν.2 Ακρίβεια μεταξύ αναλύσεων και παρτίδων (n=5)

Index	M. Τιμή	CV%
Δείγμα S1	0.3	26
Δείγμα S2	2.1	24
Δείγμα S3	3.8	9

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 των 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 ό,τι η συσκευή έκπλυσης λειτουργεί σωστά.
Χαμηλό επίπεδο ακρίβειας	Ανεπαρκής αναρρόφηση των κυψελίδων	Βεβαιωθείτε ό,τι 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. J. Husskinson, P. Stepick-Biek et al.: Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. 27: 2031 (1989).
2. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. A.M. Van Loon and J. Van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33: 635 (1980).
4. P. Stepick-Biek et al.: Contribution of specific serum IgA assay to the diagnosis of Toxoplasmosis. Ann. Pediatr. 34: 375 (1987).
5. E. Rigoli et al.: Determinazione e significato delle IgA anti-Toxoplasma gondii nell'identificazione della fase esordiente dell'infezione toxoplasmica. Microbiologia Medica 5: 95 (1990).



INSTRUCCIONES DE USO

ENZYWELL TOXOPLASMA IgA

REF 91043

(Español)

1. INDICACIONES

KIT INMUNOENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTICUERPOS IgA ANTI TOXOPLASMA GONDII EN SUERO HUMANO.

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 durante el embarazo, siendo transmitida por la madre al feto y causando graves malformaciones.

Por esta razón es importante determinar el título del anticuerpo antes el embarazo y en los sujetos no inmunes controlar con análisis frecuentes para comprobar la sueroconversión. La titulación de las IgA resulta particularmente útil para establecer suerológicamente la fase aguda de la enfermedad.

3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El test se basa en la técnica ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

El antígeno de *Toxoplasma gondii* purificado e inactivo de *Toxoplasma gondii* está unido a la fase sólida (tiras con 8 pocillos). Después de la incubación con suero humano diluido las inmunoglobulinas específicas se unen al antígeno.

Después de varios lavados para eliminar las proteínas que no han reaccionado, tiene lugar la incubación con el conjugado, compuesto de anticuerpos monoclonales humanos igG marcados con peroxidasa.

El conjugado que no se ha unido es eliminado y se añade el sustrato peroxidasa.

El color que se desarrolla es proporcional a la concentración de anticuerpos específicos presentes en la muestra de suero.

4. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Reactivos suficientes para 96 determinaciones.

Poner los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

MT PLATE MICROPLACA 12x8 pocillos recubiertos de *Toxoplasma gondii*

Uso: Abrir el envase de la placa desde el lado opuesto del código (T seguido por el número de lote); 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 con alta titulación de anticuerpos IgA anti *Toxoplasma g.* diluido en tampón fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% y ázida sódica 0.09%, líquido, listo para su uso sin dilución adicional.

Color: el color es proporcional al título

CONTROL CUT-OFF CONTROL CUT OFF 1x2 mL

Contenido: Suero humano con una titulación baja de anticuerpos IgA anti *Toxoplasma g* 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.

CONJ CONJUGADO 1 x 16 mL

Contenido: anticuerpos monoclonales humanos anti IgA marcados con peroxidasa, en una solución fosfato tamponada conteniendo fenol 0,05% Y Bronidox 0,02%. Listo para su uso sin dilución adicional.

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

IgA CONTROL - IgA CONTROL NEGATIVO 1 x 1.6 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.

WASH BUF 10x TAMPÓN DE LAVADO 10X (PF93603) 1 x 100 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUYENTE 50X (PF93703) 1 x 4.5 mL

Contenido: Solución de proteínas concentrada 50x, con anticuerpos monoclonales anti-IgG humanos, fenol 0,05% y Bronidox 0,02%.

Preparación: Diluir el volumen requerido 1:50 en el tampón de lavado con el fin de obtener el diluyente listo para su uso.

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619) 1x12 mL **INTERCAMBIABLE ENTRE LOTES**

Listo para su uso.

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 e 405 nm, con linealidades hasta OD >= 2,000)
- Lavador de Microplacas (no indispensable) para dispensar volúmenes entre 225-375 µl
- 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
SUBSTRATO	hasta la fecha de caducidad a 2/8°C, 1 semana a 15/30°C en ambiente oscuro
IgA DILUYENTE MUESTRAS	listo para su uso 2 semanas 2/8°C
DILUYENTE MUESTRAS	listo para su uso 2 semanas 2/8°C, 5 días 15/30 °C
WASH BUFFER	listo para su uso 2 semanas 2/8°C

6. PRECAUCIONES DE USO

SOLAMENTE PARA USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO. CONSERVAR A 2-8°C

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 controles contienen ázida sódica (0.09%) que con plomo y cobre puede formar depósitos explosivos de metales azidas.

.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 1 h 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 1,0%. 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 1,0%, 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 envase con las tiras por lo menos después de media hora 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 diluyente de las muestras añadiendo el IgA DILUENT 50x al tampón de lavado (0.5 mL para 25 mL).

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 e incubar de nuevo durante 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

PASO 1	Poner 100 µL de suero diluido/blanco/calibradores en los pocillos.
	-
	-
	Incubar 45 min. a 37°C
	-
	Lavar 4 veces (300 µL)
	-
PASO 2	Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo
	-
	Incubar 45 min. a 37°C
	-
	Lavar 4 veces (300 µL)
	-
PASO 3	Añadir 100 µL de Substrato a cada pocillo
	-
	Incubar 15 min. a T.A.
	-
PASO 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 (≤ 0.150) 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 valor del Cut Off debe ser por lo menos 0.2 de D.O. 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 $\geq 0,2$ a 450 nm y $\geq 0,16$ a 450/620 nm.

11. INTERPRETACIÓN DEL TEST

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

La muestra se considera:

Inmune: si la relación (Index) es > 1.2 .

Dudoso: si la relación (Index) $\pm 20\%$ del cut-off.

No-inmune: relación (Index) 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 nivel de las IgM anti-Toxoplasma se puede determinar utilizando el kit Toxoplasma IgM. Alternativamente, se analizará una segunda muestra recogida 8-14 días más tarde, para verificar un eventual aumento de las IgA. El resultado del test se debe evaluar junto con datos procedentes de otros procedimientos de diagnóstico.

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Muestras con potenciales interferentes como el Factor Reumatóideo pueden afectar el rendimiento del test. Muestras de mujeres embarazadas reactivas para anticuerpos IgG anti Toxoplasma y no reactivas para anticuerpos IgM específicos no interfieren el test.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIAGNÓSTICO

En una prueba clínica, se analizaron 135, de las cuales 29 pertenecientes a pacientes con infección aguda (IgM positivos). Las muestras se probaron en comparación con otro método inmunoenzimático comercial. Los resultados están resumidos en la tabla siguiente:

	otro método	
	POS	NEG
Diese POS	27	2
NEG	2	104

La sensibilidad y especificidad diagnóstica del método resultan ser respectivamente 93% (78-98% IC al 95%) e 98% (93-99% IC al 95%)

15. PRECISIÓN

Precisión intra-ensayo (n=6)

Muestra	D.O. media	D.S.	CV%
S1	0.112	0.01	9
S2	0.743	0.036	5
S3	1.307	0.056	4

Tab.2 Precisión entre pruebas y lotes (n=5)

Index	Media	CV%
Muestra S1	0.3	26
Muestra S2	2.1	24
Muestra S3	3.8	9

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 substrato añadido a la placa	Controlar el funcionamiento de la pipeta.

17. BIBLIOGRAFÍA

- 1.J. Husskinson, P. Stepick-Biek et al.: Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. 27: 2031 (1989).
- 2.G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. A.M. Van Loon and J. Van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33: 635 (1980).
4. P. Stepick-Biek et al.: Contribution of specific serum IgA assay to the diagnosis of Toxoplasmosis. Ann. Pediatr. 34: 375 (1987).
5. E. Rigoli et al.: Determinazione e significato delle IgA anti-Toxoplasma gondii nell'identificazione della fase esordiente dell'infezione toxoplasmica. Microbiologia Medica 5: 95 (1990).



INSTRUCTIONS POUR L'EMPLOI

**ENZYWELL
TOXOPLASMA IgA**
REF 91043**(Français)****1. UTILISATION**

MÉTHODE IMMUNOENZYMATIQUE POUR LA DÉTERMINATION QUALITATIVE DES ANTICORPS IgA ANTI- TOXOPLASMA GONDII DANS LE SÉRUM 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 dosage des IgA est très utile pour établir la phase sérologique aiguë de la maladie.

3. PRINCIPE

Le test est basé sur le principe ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). L'antigène se constitue de *Toxoplasma gondii* purifié et inactif et il est lié à la phase solide (puits de la barrette 1x8). A travers l'incubation avec le sérum humain dilué, les immunoglobulines spécifiques se lient à l'antigène. Après des lavages permettant d'éliminer les protéines qui ne se sont pas liées, on effectue l'incubation avec le conjugué se constituant d'anticorps monoclonaux anti-IgA humaines marqués à la peroxydase.

Le conjugué qui ne s'est pas lié est éliminé et l'on ajoute le substrat. La couleur qui apparaît dépend de la concentration en anticorps spécifiques dans le sérum examiné.

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 le *Toxoplasma gondii*

Utilisation : Découper le sachet du côté opposé au code (T, 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 1 x 1.6 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgA anti-toxoplasme, 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 des contrôles dépend de la concentration en anticorps.

CONTROL CUT-OFF CONTROLE SEUIL 1 x 2 mL

Composition : Sérum humain dilué contenant une quantité connue d'anticorps IgA anti-toxoplasme, 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 des contrôles dépend de la concentration en anticorps.

CONJ CONJUGUE 1 x 16 mL

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

Préparation : Prêt à l'emploi.

IgA CONTROL - CONTROLE NEGATIF IgA (PF93910) 1 x 1.6 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.

WASH BUF 10x TAMPON DE LAVAGE 10X (PF93603) 1 x 100 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.

IgA SAMP DIL 50x IgA DILUANT 50X (PF93703) 1 x 4.5 mL Pour diluer les échantillons de sérum.

Composition : Solution protéique (concentrée 50 fois), contenant des anticorps monoclonaux anti-IgG humaines, additionnée de 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox.

Diluer au 1/50 dans la solution tamponnée de lavage pour obtenir une solution de diluant prête à l'emploi.

SUBS TMB SUBSTRAT (PF93619) 1 x 12 mL Prêt à l'emploi. **LOTS INTERCHANGEABLES**

Composition : Tétraméthylbenzidine (à 0.26 mg/ml) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 0.01 %) stabilisé dans un tampon citrate (à 0.05 mol/l). pH = 3.8.

H₂SO₄ 0.3 M SOLUTION D'ARRET (PF93602) 1 x 16 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 °C
- Lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 NM ou 450/620 nm, avec linéarité jusqu'à ≥ 2.000)
- Laveur de microplaques (pas indispensable) capable de fournir des volumes de 225-375 μ L
- Eau distillée ou désionisée
- Verrerie normale de laboratoire (éprouvettes, pipettes, etc...)
- Micropipette pour le prélèvement précis de 10, 100, 1000 μ L 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 le coffret.

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.
SERUMS DE CONTROLE	5 semaines à 2/8 °C.
CONJUGUE	5 semaines à 2/8 °C.
SUBSTRAT	jusqu'à péremption à 2/8 °C, 1 semaine à 15/30 °C, dans l'obscurité.
IgA DILUANT 50x	prêt à l'usage 2 semaines 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.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS POUR LA SECURITE 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) Les contrôles contiennent de l'azide de sodium (0.09 %). 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'hypochlorite 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, il est possible de faire incuber les plaques dans un 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

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

Préparation :

- 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 du diluant :
Ajouter le **diluant concentré** à la **solution de lavage** (exemple : 2 ml dans 98 ml d'eau distillée).

Exécution

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 du conjugué 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/blanc/contrôles dans les puits de la barrette.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver 4 fois pendant 30 secondes (300 µl)

2e ETAPE Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits.

Incuber pendant 45 minutes à 37 °C.

Laver pendant 30 seconde à 4 reprises (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

Lire les absorptions à 450 nm et en déduire la valeur de la D.O du blanc (≤ 0.150).

Calculer les valeurs du contrôle seuil. Aucune valeur ne doit s'écarter de plus de $\pm 25 \%$ de la valeur moyenne si l'analyse est faite en triple; 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 des D.O du contrôle négatif et du sérum seuil doit être $\leq 0,6$. La D.O. du contrôle seuil doit être ≥ 0.2 à 450 nm et ≥ 0.16 à 450/620 nm.

11. INTERPRETATION DU TEST

Résultats qualitatifs

Si la valeur de l'O.D. du sérum est supérieure au sérum seuil, l'échantillon est positif en présence des IgA spécifiques.

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 (Index) est > 1.2

Incertain: si le rapport (Indice) est compris entre 0.8 et 1.2
Négatif : si le rapport (Indice) 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 DU TEST

Le niveau des IgM anti-toxoplasmose peut être déterminé en utilisant le kit Enzywell Toxoplasma IgM. Autrement, un deuxième échantillon prélevé 8-14 jours plus tard, devrait être contrôlé en parallèle pour déterminer un incrément des anticorps IgA. Les résultats obtenus servent seulement en tant que support pour le diagnostic et ils doivent être interprétés avec d'autres observations.

13. SPECIFICITE ANALYTIQUE

Les échantillons contenant des substances potentiellement interférentes, comme les Facteurs Rhumatoïdes, peuvent altérer les résultats du test.

Les échantillons provenant de femmes enceintes, réactives aux IgG anti-Toxoplasma mais non aux IgM spécifiques, n'interfèrent pas avec le résultat.

14. SENSIBILITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUES

135 échantillons ont été analysés lors d'une expérimentation clinique effectuée dans un laboratoire hospitalier : 29 appartenaient à sujets atteints d'une infection aiguë (IgM positifs). La comparaison a été effectuée avec une autre méthode disponible dans le commerce. Les résultats sont reportés ci-dessous :

	Autre méthode	
	POS	NEG
Diesse POS	27	2
NEG	2	104

La sensibilité et la spécificité diagnostique sont 93 % (78-98 % IC à 95 %) et 98 % (93-99 % IC à 95 %), respectivement.

15. PRECISION

Tableau 1 Précision dans la série (n=6)

Echantillon	Moyen O.D.	S.D.	CV %
S1	0.112	0.01	9
S2	0.743	0.036	5
S3	1.307	0.056	4

Tableau 2 Précision entre séries (n=5)

Indice	Moyen	CV %
Echantillon S1	0.3	26
Echantillon S2	2.1	24
Echantillon S3	3.8	9

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 le mode d'emploi, paragraphe 4).
		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 le laveur fonctionne

		correctement
Précision insuffisante	Lavage incomplet des puits	S'assurer que le laveur fonctionne correctement
	Aspiration insuffisante des puits	S'assurer que le laveur 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. BIBLIOGRAPHIE

1. J. Husskinson, P. Stepick-Biek et él.: Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclass during acute and chronic infection. J. Clin. Microbiol. 27: 2031 (1989).
2. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
3. A.M. Van Loon and J. Van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33: 635 (1980).
4. P. Stepick-Biek et él.: Contribution of specific serum IgA assay to the diagnosis of Toxoplasmosis. Ann. Pediatr. 34: 375 (1987).
5. E. Rigoli et él.: Determinazione e significato delle IgA anti-Toxoplasma gondii nell'identificazione della fase esordiente dell'infezione toxoplasmica. Microbiologia Medica 5: 95 (1990).

	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 Fabbricante	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
Strada dei Laghi 39
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111