



NovaLisa™

Toxoplasma gondii

IgG – ELISA

CE 0483

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG-class antibodies against *Toxoplasma gondii* in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur quantitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination quantitative des anticorps IgG contre *Toxoplasma gondii* en sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli anticorpi della classe IgG per *Toxoplasma gondii* nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cuantitativa de los anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii* en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 7
Deutsch:	Seite	8 bis 13
Français:	Page	14 à 19
Italiano:	da Pagina	20 a 25
Espanol:	Página	26 a 31

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografia	Page / Seite / Page / Pagina / Página	34
---	--	----

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	35
--	--	----

Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	36
--	---	----

Product Number: TOXG0460 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is a small intracellular parasite, whose live cycle has a sexual and an asexual phase. Sexual development is restricted to the intestinal cells of (probably exclusively) cats; the oocysts formed are excreted and due to their resistant cell walls they may be infectious under advantageous circumstances for at least 1 year. Animals and man are intermediate hosts for the asexual proliferation of *T. gondii*: the ingested parasites will proliferate explosively within the host cells lysing them eventually. They disseminate throughout the body via circulation and lymphatic system and though may infect any cell type. In muscle and brain cells cysts are formed which are spheroidal and about 5-100 µm in diameter. Cysts are virtually immortal in the intermediate host.

Toxoplasma gondii is the most common parasite in humans, but its abundance (7-80%) is highly dependent on the geographic area, the socio-economic status and the nutritional customs. Infection only rarely causes toxoplasmosis and usually clinical symptoms are absent, but may produce severe problems in immunosuppressed persons and fetus. Because only a primary infection during pregnancy may be dangerous and even fatal for the unborn (the probability of congenital infection is about 50%), the recent onset of an infection must be excluded. In pregnant women in over 98% of cases, the absence of IgM excludes the possibility of recent infection. In newborns the very presence of anti-toxoplasma IgM is sufficient to confirm a congenital toxoplasmosis, since maternal IgM, unlike IgG, does not cross the placental barrier. But a significant number of infected infants do not develop detectable IgM levels and thus are false negative. In immunosuppressed patients toxoplasmosis causes severe complications mostly by reactivation of an earlier latent infection.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of infection
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	<p>Acquired Toxoplasmosis: lymphadenopathy, retinochoroiditis</p> <p>Congenital Toxoplasmosis: hydrocephalus and microcephaly, intracranial calcifications, chronical chorioretinitis</p>	<p>Direct: oocysts (cats): ingestion by food including water, which is contaminated by feces of cats or contaminated soil.</p> <p>Indirect: Ingestion of cysts by eating raw or insufficiently cooked meat, esp. pork</p> <p>Congenital infection of the fetus</p>

Infection may be identified by

- PCR
- Indirect immunofluorescence (IIF)
- Serology: Detection of antibody production by ELISA

2. INTENDED USE

The NovaTec *Toxoplasma gondii* IgG-ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against *Toxoplasma gondii* in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against *Toxoplasma gondii* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with inactivated *Toxoplasma gondii* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Toxoplasma gondii* specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of *Toxoplasma gondii* specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Toxoplasma gondii Coated Wells (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with *Toxoplasma gondii* antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2, coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer for washing the wells; pH 7.2 ± 0.2; white cap.
- **Toxoplasma gondii anti-IgG conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibodies to human IgG; coloured blue; ready to use; black cap.
- **TMB Substrate:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.

- **Toxoplasma gondii IgG Standards***:** 4 vials, each containing 2ml; coloured yellow; ready to use:

Standard A:	0	IU/ml; blue cap
Standard B:	50	IU/ml; green cap
Standard C:	100	IU/ml; yellow cap
Standard D:	200	IU/ml; red cap

- * contains 0.1 % Bronidox L after dilution
- ** contains 0.2 % Bronidox L
- *** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with inactivated *Toxoplasma gondii* antigens. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Toxoplasma gondii anti-IgG Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human IgG horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Standards

The vials labelled with Standard A, B, C and D contain a ready to use standard solution. The concentration of the standards, calibrated in accordance with the 3rd International Standard of the WHO, are:

Standard A:	0 IU/ml
Standard B:	50 IU/ml
Standard C:	100 IU/ml
Standard D:	200 IU/ml

The solutions have to be stored at 2...8°C and contain 0.1% Kathon. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2... 8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents, stabilizers and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2 ... 8°C.
After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*
Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

For patients with expected concentrations greater than Standard D (200 IU/ml) a second 1 + 1 dilution of this 1 + 100 diluted patient sample should be performed; e.g. 100 µl of first sample dilution + 100 µl of IgG sample diluent (mix well). Dilution factor: 2

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well (e.g. A1) for the substrate blank,
4 wells (e.g. B1, C1, etc.) for Standard A, B, C and D.

It is recommended to determine patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl of each Standard (A, B, C and D) and diluted samples into the respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content off the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100µl Toxoplasma anti-IgG Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20 to 25°C).** *Do not expose to direct sunlight.*
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 to 25°C) in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample - as described under 7.1. Sample Dilution - is recommended.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the substrate blank in well A1.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at 450 nm and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Assay validation criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrat-Blank** in A1: Absorbance < **0.100**
- **Standard A** in B1: Absorbance < **0.200**
- **Standard B** in C1: Absorbance > **0.300**
- **Standard C** in D1: Absorbance > **0.500**
- **Standard D** in E1: Absorbance > **1.000**

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in IU/ml** plot the (mean) absorbance values of the 4 Standards A, B, C and D on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 50, 100 and 200 IU/ml) and draw a standard calibration curve (absorbance values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

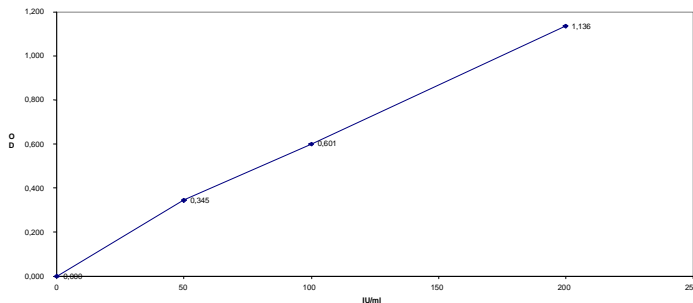
Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each patient specimen and control.

Note: In consequence of calibrating the Toxoplasma gondii IgG standards according to the "3rd International Standard Preparation" of the WHO, different results will be obtained in direct comparison to those achieved so far using standards calibrated in accordance with the "2nd International Standard Preparation".

NOTE: Readings of additionally (1+1) diluted patient samples must be multiplied by the appropriate dilution factor in order to obtain correct results! (Dilution: 1+1 = Dilution factor: 2). (See chapter "Sample Dilution, 7.1.")

All suitable computer programs available can be used for automated result reading and calculation. The following mathematical functions can be used: Linear regression or Point to Point calculation of the standard curve.

9.3. Typical Calibration Curve



For the calculation of the standard-curve 3 different mathematical functions can be used:

- Linear Regression
- Point to Point
- Cubic spline

9.4. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own patient populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

- Reactive** > 35 IU/ml
- Grey zone (equivocal):** 30 - 35 IU/ml
- Non reactive:** < 30 IU/ml

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean value	CV (%)
Standard B	6	0.978	5.7
Standard C	6	1.647	5.3
Standard D	6	2.496	6.2
Interassay	n	Mean value	CV (%)
Standard B	4	0.752	7.1
Standard C	4	1.26	10.1
Standard D	4	1.98	6.3

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 98.2%.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 96.6%.

10.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity – defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator – is 1.0 IU/ml.

10.5. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 30 mg/ml triglycerides and 10 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromized patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: TOXG0460 Toxoplasma gondii IgG-ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Toxoplasma gondii ist ein ubiquitärer Gewebeparasit von Säugetieren. Es handelt sich um intrazelluläre Parasiten, in deren Lebenszyklus eine sexuelle und eine asexuelle Phase unterschieden werden kann. Hauptwirt des Erregers ist die Katze (sexuelle Vermehrung), Nebenwirt der Mensch (asexuelle Vermehrung). Man kennt weltweit über 200 Vogel- und Säugetierarten, die als Zwischenwirte auftreten können. Zysten mit ungeschlechtlichen Vermehrungsstadien können generalisiert in allen Organen auftreten. In der Darmwand der Katze kann zusätzlich eine geschlechtliche Vermehrung stattfinden. Infizierte Katzen scheiden Oozysten in großer Zahl mit dem Stuhl aus. Diese sind gegen Umwelteinflüsse außerordentlich resistent und können jahrelang überleben.

Die Infektion erfolgt durch orale Aufnahme von Zysten in ungenügend gekochtem Fleisch oder durch orale Aufnahme von Oozysten aus Katzenkot.

Nach Aufnahme der Oozysten werden je 8 bogenförmige Sporoziten freigesetzt, die die Darmwand penetrieren, Zellen des RES befallen und sich dort in 16-32 Tochterzellen teilen (Endo- oder Tachyzoiten). Diese befallen weitere Körperzellen, was zu Schäden an Herz, Skelettmuskulatur, ZNS, Leber, Plazenta, etc. führt. Mit dem Einsetzen der Immunantwort wird die Vermehrung der Erreger unterbunden, die nunmehr Brady- oder Zystozysten genannt werden. Diese leben noch jahrelang im Gewebe weiter, wo sie Pseudozysten bilden, die den Wirt nicht schädigen, aber dennoch infektiös sind. Eine endogene Reaktivierung ist bei Schädigung des Immunsystems (z.B. HIV, Medikamente) noch nach Jahren möglich.

Toxoplasma gondii ist weit verbreitet. Die Durchseuchung der Bevölkerung nimmt mit dem Alter zu und erreicht in der Altersgruppe der 60-65 Jährigen etwa 70%. Die Prävalenz ist stark abhängig von der geographischen Region, des sozioökonomischen Status sowie von den Ernährungsgewohnheiten. In der Regel verläuft die postnatal erworbene *Toxoplasma* Infektion ohne Krankheitserscheinungen, ansonsten manifestiert sie sich hauptsächlich als Lymphknoten-Toxoplasmose. Infiziert sich eine Mutter während der Schwangerschaft erstmalig mit Toxoplasmen, können die Erreger auf den Fötus übergehen, wo sie sich dann nahezu unbremst vermehren können. Da nur die Erstinfektion während der Schwangerschaft für den Fötus schwere Folgen nach sich zieht, sollten beginnende Infektionen ausgeschlossen werden. In über 98% der Fälle schließt das Fehlen von IgM-Antikörpern eine aktuelle Erstinfektion bei der Schwangeren aus. Beim Neugeborenen ist der Nachweis kleinster Mengen IgM-Antikörper ausreichend zur Bestätigung einer kongenitalen Toxoplasmose, da mütterliches IgM, im Gegensatz zu IgG, die Plazentaschranke nicht passiert. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass das Neugeborene keine nachweisbaren Antikörperspiegel entwickelt und so falsch negativ reagiert.

Spezies	Übertragungsweg	Symptome	Komplikationen	Diagnostik
Toxoplasma gondii	orale Aufnahme der Erreger	in der Regel keine, nur selten Lymphadenopathie, Fieber, Myalgien	Erstinfektion in der Schwangerschaft → kongenitale Infektion des Fötus	PCR
	direkte Aufnahme der Oozysten (Katze) indirekte Aufnahme von Zysten aus ungenügend gekochtem Fleisch	nach transplazentärer Infektion: Hydro- u. Mikrozephalus, Chorioretinitis, intrakranielle Verkalkungen	Reaktivierung (HIV)	Immunfluoreszenz Serologie

Nachweis:

- PCR
- Indirekte Immunfluoreszenz
- Serologie: Antikörpernachweis mittels ELISA

IgG-Antikörper sind serologische Marker einer persistierenden Infektion mit *T. gondii*, die Präsenz von IgM-Antikörpern deutet auf eine akute Infektion hin.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec *Toxoplasma gondii* IgG-ELISA ist für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die quantitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischem IgG gegen *Toxoplasma gondii* beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit inaktiviertem *Toxoplasma gondii* Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP) -konjugierte anti-human-IgG Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Toxoplasma gondii beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Toxoplasma gondii Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.)*:** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Toxoplasma gondii anti-IgG-Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG; blau gefärbt; gebrauchsfertig, schwarze Verschlusskappe;
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Toxoplasma gondii IgG Standards***:** 4 Fläschchen, je 2 ml, gebrauchsfertig:
Standard A: 0 IU/ml; blaue Verschlusskappe
Standard B: 50 IU/ml; grüne Verschlusskappe
Standard C: 100 IU/ml; gelbe Verschlusskappe
Standard D: 200 IU/ml; rote Verschlusskappe

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur(20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Toxoplasma gondii Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Toxoplasma gondii anti-IgG Konjugat

Das Fläschchen enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgG-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Standards

Die Fläschchen mit Nullstandard A und Standards B, C und D enthalten 2.0 ml gebrauchsfertige Standardlösung. Die Konzentrationen der Standards, nach dem 3. Int. Standard der WHO von 1994 standardisiert, sind:

Standard A: 0 IU/ml

Standard B: 50 IU/ml

Standard C: 100 IU/ml

Standard D: 200 IU/ml

Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1% Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humanes Serum oder Plasma (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!* Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

Proben mit erwarteten Antikonzentration oberhalb der Konzentration von Standard D (200 IU/ml) sollten nach der oben beschriebenen Verdünnung 1+1 weiter verdünnt werden, z.B. 100µl der ersten Probenverdünnung + 100µl IgG-Probenverdünnungspuffer (Verdünnungsfaktor: 2).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
4 Vertiefungen	(z.B. B1,C1, etc)	für die Standards A, B, C und D.

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Standards und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Standard A, B, C und D und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschwasser waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Filterpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 100µl Toxoplasma gondii anti-IgG Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe wie unter 7.1. beschrieben weiter zu verdünnen und den Test zu wiederholen.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der vier Standards und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- | | | |
|----------------------------|--------|---------------------------|
| ▪ Substrat-Leerwert | in A1: | Extinktion < 0.100 |
| ▪ Standard A | in B1: | Extinktion < 0.200 |
| ▪ Standard B | in C1: | Extinktion > 0.300 |
| ▪ Standard C | in D1: | Extinktion > 0.500 |
| ▪ Standard D | in E1: | Extinktion > 1.000 |

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

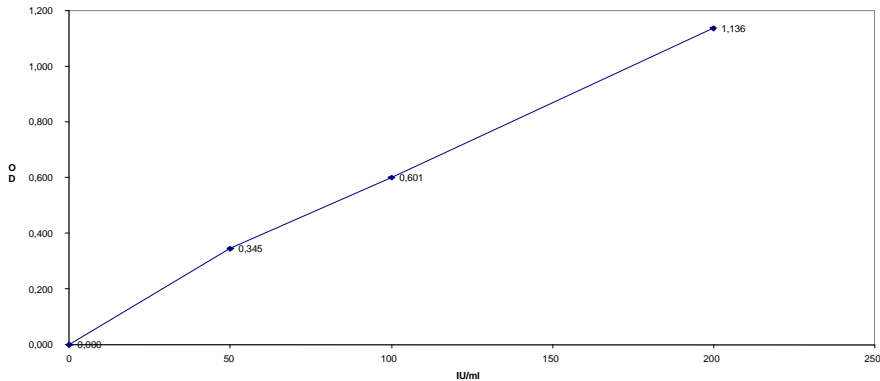
Um **quantitative Ergebnisse in IU/ml** zu erhalten, die Extinktionswerte der vier Standards A, B, C, und D gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 50, 100, 200 IU/ml) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve Ergebnisse die gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Bezeichnung: Ergebnisse zusätzlich (z.B. 1+1) verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden! (Verdünnung 1+1; Verdünnungsfaktor: 2)

Im Handel erhältliche Auswertungsprogramme ermöglichen eine automatische Erstellung der Standardkurve und Kalkulation der Ergebnisse. Zur Berechnung der Standardkurve können die lineare Regression bzw. Punkt zu Punkt Funktionen gewählt werden.

9.2.1 Typische Standardkurve



9.3. Interpretation der Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Patientenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

Reaktiv: >35 IU/ml
Grauzone: 30 – 35 IU/ml
Nicht-reaktiv: <30 IU/ml

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Standard B	6	0.978	5.7
Standard C	6	1.647	5.3
Standard D	6	2.496	6.2

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Standard B	4	0.752	7.1
Standard C	4	1.26	10.1
Standard D	4	1.98	6.3

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 98.2 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 96.6 %.

10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Tests ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie beträgt 1.0 IU/ml.

10.5. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 30 mg/ml Triglyceride und von 10 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Der Test wurde mit EDTA- und Citrat- Plasma evaluiert, nicht mit Heparin-Plasma.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG:	Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.
-----------------	--

WARNUNG:	Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
-----------------	--

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: TOXG0460 Toxoplasma gondii IgG-ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un petit parasite intracellulaire, dont le cycle de vie comprend une phase sexuelle et une phase asexuelle. Le développement sexuel est limité (probablement exclusivement) aux cellules intestinales des chats ; les oocystes ainsi formés sont excrétés et en raison de leurs membranes cellulaires résistantes ils peuvent être infectieux pendant au moins 1 an dans des circonstances avantageuses. Les animaux et l'homme sont les hôtes intermédiaires pour la prolifération asexuelle de *Toxoplasma gondii*. Après l'ingestion, les parasites prolifèrent énormément dans les cellules hôtes et finissent par les lyser. Ils disséminent dans tout le corps par voie de circulation et du système lymphatique et peuvent cependant infecter n'importe quel autre type de cellules. Des kystes en forme sphéroïdale d'environ 5-100µm de diamètre se développent dans les cellules des muscles et du cerveau. Les kystes sont pratiquement immortels dans l'hôte intermédiaire.

Toxoplasma gondii est le parasite le plus commun chez l'homme, mais son abondance (7-80%) dépend fortement de la région géographique, du statut socio-économique et des coutumes alimentaires. L'infection ne cause que rarement la toxoplasmose et d'habitude, il n'y a pas de symptômes cliniques. Néanmoins, l'infection peut produire de graves problèmes chez les personnes immunosupprimées et les fœtus. Puisque seulement une infection primaire pendant la grossesse peut être dangereuse et même mortelle pour le fœtus (la probabilité d'une infection congénitale est d'environ 50%), le début récent d'une infection doit être exclu. Dans les femmes enceintes, dans plus de 98% de cas, l'absence d'IgM exclut la possibilité d'infection récente. Dans les nouveaux-nés, rien que la présence d'anti-toxoplasme IgM est suffisante pour confirmer une toxoplasmose congénitale, car igM maternel, contrairement à l'IgG, ne franchit pas la barrière placentaire. Cependant, un nombre significatif de nourrissons infectés ne développe pas des niveaux discernables d'IgM et se montre ainsi faux négatif. La toxoplasmose cause de graves complications dans les patients immunosupprimés, souvent provoquées par la réactivation d'une infection latente.

Espèce	La maladie	Symptômes	Mécanisme de l'infection
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose	<p>Toxoplasmose aigüe : lymphadénopathie, retinochorioiditis</p> <p>Toxoplasmose congénitale : Hydrocéphalie et microcéphalie, calcifications intra-crâniennes, choriorétinite chronique</p>	<p>Direct : oocystes (chats) : ingestion par la nourriture, y compris l'eau souillée par des selles de chats ou par le sol souillé.</p> <p>Indirect : Ingestion de kystes par la viande crue ou insuffisamment cuite, surtout la viande de porc</p> <p>Infection congénitale du fœtus</p>

L'infection peut être identifiée par

- PCR
- Immunofluorescence indirecte

Sérologie : Détection de la production d'anticorps par ELISA

2. UTILISATION PRÉVUE

L'ELISA d'IgG *Toxoplasma gondii* de NovaTec est prévu pour la détermination quantitative des anticorps IgG contre *Toxoplasma gondii* en sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DE L'ANALYSE

La détermination immunoenzymatique quantitative des anticorps IgG contre *Toxoplasma gondii* est basée sur la technique d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Des puits dans les bandes du plaque microtitre sont recouverts d'antigènes de *Toxoplasma gondii* pour attacher les anticorps correspondants du spécimen. Après le lavage des puits ayant pour but d'enlever l'échantillon détaché, l'anti-humain IgG conjugué à HRP (horseradish peroxidase) est ajouté. Ce conjugué s'attache aux anticorps spécifiques pour *Toxoplasma gondii*. Le complexe immun constitué par le conjugué attaché est visualisé en ajoutant le substrat de Tetraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques pour *Toxoplasma gondii* dans le spécimen. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA.

4. MATÉRIAUX

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts de *Toxoplasma gondii* (IgG) :** 12 bandes cassables contenant 8 puits recouvertes d'antigènes de *Toxoplasma gondii*; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant de l'échantillon IgG *** :** 1 bouteille contenant 100 ml d'amortisseur pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; coloré jaune ; prêt à utiliser ; couvercle blanc.
- **Solution D'Arrêt :** 1 bouteille contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à utiliser ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (20x concentré.) * :** 1 bouteille contenant 50 ml d'un amortisseur 20-fois concentré (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; couvercle blanc.

- **Conjugué anti-IgG Toxoplasma gondii **** : 1 bouteille contenant 20 ml d'anticorps de lapin conjugués à peroxydase contre l'IgG humain ; coloré bleue, prêt à utiliser ; couvercle noir.
- **Solution de substrat de TMB** : 1 bouteille contenant 15 ml 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à utiliser ; couvercle jaune.
- **Toxoplasma gondii IgG Standards ***** : 4 bouteilles, chacune contenant 2 ml, coloré jaune; prêt à utiliser.

Standard A :	0	IU/ml ; couvercle bleu
Standard B :	50	IU/ml ; couvercle vert
Standard C :	100	IU/ml ; couvercle jaune
Standard D :	200	IU/ml ; couvercle rouge

* contient 0.1 % de Bronidox L après dilution

** contient 0.2 % de Bronidox L

*** contient 0.1 % de Kathon

4.2. Matériaux fournis

- 1 support de bande
- 1 couverture autocollante
- 1 protocole d'essai
- 1 plan de distribution et d'identification

4.3. Matériaux et équipement requis

- lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA, équipé pour le mesurage de l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur 37°C
- Équipement manuel ou automatique pour rincer les puits
- Pipettes pour usage entre le 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (fraîchement) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITÉ ET STOCKAGE

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'échéance indiquée sur l'étiquette une fois stockés à 2... 8°C.

6. PRÉPARATION DE RÉACTIF

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient à la température de la pièce (20... 25°C) avant de commencer l'analyse!

6.1. Bandes recouvertes cassables

Les bandes cassables sont recouvertes d'antigène de Toxoplasma gondii et sont prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après avoir détaché des bandes, les bandes restantes devraient tout de suite être refermées dans le sachet d'aluminium avec le desiccant fourni et être conservées à 2... 8°C; stable jusqu'à la date d'échéance. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.2. Conjugué anti-IgG Toxoplasma gondii

La bouteille contient 20ml d'une solution avec de la peroxydase de raifort anti-humaine-IgG, l'amortisseur, les stabilisateurs, les préservatifs et un colorant bleue inerte. La solution est prêt à utiliser. Conserver à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.3. Standards

Les fioles marquées avec standard A, B, C et D contiennent une solution standard prêt à utiliser. La concentration des standards, calibrée selon le 3. standard international de l'OMS, est :

Standard A :	0 IU/ml
Standard B :	50 IU/ml
Standard C :	100 IU/ml
Standard D :	200 IU/ml

Les solutions contiennent 0.1% Kathon et doivent être stockée à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2...8°C.*

6.4. Diluant de l'échantillon IgG

La bouteille contient 100ml d'un amortisseur de phosphate, des stabilisateurs, des préservatifs et un colorant jaune inerte. Elle est employée pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prêt à utiliser doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.5. Solution de lavage (20x conc.)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. *Le tampon dilué est stable pendant cinq jours si conservé à +2...+8°C. Le tampon concentré reste stable jusqu'à la date de péremption s'il est conservé à +2...+8°C. Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat de TMB

La bouteille contient 15ml d'un système de peroxyde de tetramethylbenzidine/hydrogen. Le réactif est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C, loin de la lumière. *La solution devrait être sans couleur ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat se transforme en bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

La bouteille contient 15ml d'une solution acide sulfurique de 0.2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prêt à utiliser et doit être stocké à 2... 8°C. *Après premier usage stable jusqu'à la date d'échéance une fois stocké à 2... 8°C.*

7. COLLECTION ET PRÉPARATION DES SPÉCIMENS

Utilisez des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si l'analyse est exécutée dans un délai de 5 jours après la collection de l'échantillon, le spécimen devrait être maintenu à 2... 8°C ; autrement ils devraient être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, mélangez les échantillons décongelés bien avant l'analyse. *Évitez congélation et décongélation répétée.*

L' inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant l'analyse, tous les échantillons devraient être dilués 1+100 avec le diluant de l'échantillon IgG.

Diluer 10µl de l'échantillon avec 1ml du diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1+100 et mélanger celle-ci soigneusement par un Vortex. *Les standards sont prêts à utiliser et ne doivent pas être dilués.*

Pour des patients avec des concentrations prévues plus élevées que standard D (200 IU/ml), une deuxième dilution 1+1 de cet échantillon dilué 1+100 devrait être utilisée ; par exemple 100 µl de la première dilution d'échantillon + 100 µl du diluant de l'échantillon IgG (mélanger soigneusement). Facteur de dilution : 2

8. PROCÉDÉ D'ANALYSE

8.1. Préparation d'analyse

Veillez lire le protocole de l'analyse soigneusement **avant d'exécuter** l'analyse. La fiabilité des résultats dépend de l'adhérence stricte au protocole de l'analyse comme décrit. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer l'analyse, le plan de distribution et d'identification pour tous les spécimens et contrôles devrait être soigneusement établi sur la feuille de résultat fournie dans le kit. Choisissez le nombre requis de bandes ou de puits microtitres et insérez-les dans le support.

Veillez assigner au moins :

1 puits (par exemple A1) pour le substrat blanc,
4 puits (par exemple B1, C1, etc.) pour les standards A, B, C et D.

C'est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient deux fois, si nécessaire.

Exécutez toutes les étapes de l'analyse dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Une pointe de pipette propre et jetable devrait être employée pour aliquoter chaque contrôle et échantillon.

Ajuster l'incubateur à 37° ± 1°C.

1. Pipettez 100µl de standard (A, B, C et D) et les échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Gardez le puits A1 pour le substrat blanc.
2. Couvrez les puits de couvertures autocollantes.
3. **Incuber pour 1 heure ± 5 minutes à 37±1°C.**
4. Quand l'incubation a été accomplie, enlevez la couverture, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300µl de solution de lavage. Évitez les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5sec. À la fin, enlevez soigneusement le fluide restant en tapant les bandes sur des papiers en tissu avant la prochaine étape !

Note : Le lavage est décisif ! Un lavage insuffisant peut mener à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipettez 100µl du conjugué anti-IgG *Toxoplasma gondii* dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermez avec la couverture autocollante.
6. **Incuber pendant 30 minutes à la température de la pièce.** *Ne pas exposer à la lumière du soleil directe.*
7. Répétez l'étape numéro 4.
8. Pipetter 100µl de la solution de substrat de TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à la température de la pièce dans l'obscurité.**

10. Pipetter 100µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat de TMB.

N'importe quelle couleur bleue développée pendant l'incubation se transforme en jaune.

Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de la densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec la solution physiologique de chlorure de sodium, par exemple 1+1. Ensuite diluer l'échantillon 1+100 avec l'amortisseur et multiplier les résultats en IU/ml par 2.

11. Mesurer l'absorption du spécimen à 450/620nm dans un délai de 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesurage

Ajuster le lecteur plaque microtitre (microwell plate reader) d'ELISA à **zéro** en utilisant **le substrat blanc dans le puits A1**.

Si - pour raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le substrat blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorption du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorption mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorption de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorption pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture bichromatique de longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est recommandée.

En cas de plusieurs mesurages, calculer **les valeurs moyennes d'absorption** de tous les résultats.

9. RÉSULTATS

9.1. Critères De Validité

Afin qu'une analyse soit considérée valide, les critères suivants doivent être respectés :

▪ Blanc Substrat	dans A1 :	Valeur d'absorbance < 0.100 .
▪ Etalon A	dans B1 :	Valeur d'absorbance < 0.200 .
▪ Etalon B	dans C1 :	Valeur d'absorbance > 0.300
▪ Etalon C	dans D1 :	Valeur d'absorbance > 0.500
▪ Etalon D	dans E1 :	Valeur d'absorbance > 1.000

Etalon A < Etalon B < Etalon C < Etalon D

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des **résultats quantitatifs en IU/ml**, inscrire les valeurs (moyennes) d'absorption des 4 standards A, B, C et D sur papier millimétré (linéaire/ linéaire) dans un système de coordonnées.

Inscrire les valeurs d'absorption sur l'axe verticale et leurs concentrations correspondantes (0, 50, 100 et 200 IU/ml) sur l'axe horizontale, et dessiner une courbe d'étalonnage standard.

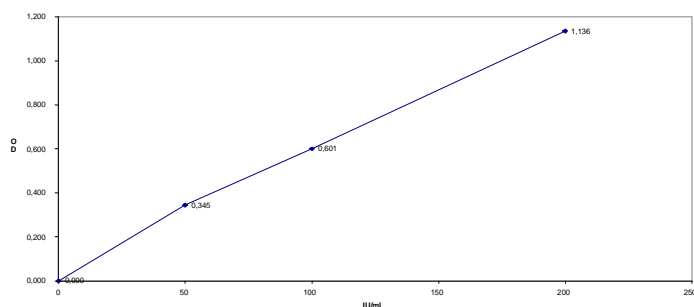
Lire les résultats de cette courbe standard en utilisant les valeurs (moyennes) d'absorbance de chaque spécimen patient et de chaque standard.

NOTE : Vu que les standards de Toxoplasma gondii IgG ont été calibrés selon la «préparation du troisième standard international» de l'OMS, des résultats différents de ceux en concordance avec le «deuxième standard international» seront obtenus.

NOTE : Les résultats des échantillons dilués une deuxième fois (1+1) doivent être multipliés par le facteur de dilution approprié afin d'obtenir des résultats corrects ! (dilution : 1+1 = facteur de dilution : 2). (voir chapitre 7.1. « Dilution de l'échantillon »).

Tous les programmes d'ordinateur appropriés peuvent être employés pour la lecture et le calcul automatiques des résultats. Le mathématique suivant des fonctions peuvent être employées : Régression linéaire ou point pour diriger le calcul de la courbe standard.

9.3. Courbe d'Étalonnage Typique



Pour le calcul de la courbe standard, 3 fonctions différentes peuvent être employées :

- Régression linéaire
- Point à point
- Spline cubique

9.4. Interprétation des résultats

Des gammes normales de valeur pour cet ELISA devraient être établies par chaque laboratoire basé sur ses propres patients (des variations géographiques peuvent se produire).

Les valeurs suivantes devraient être considérées comme directives :

Réactif	> 35 IU/ml
Zone grise (équivoque) :	30 - 35 IU/ml
Non réactif :	< 30 IU/ml

10. CARACTÉRISTIQUES D'EXÉCUTION

10.1. Précision

Intra-analyse	n	moyenne (E)	cv (%)
Standard B	6	0.978	5.7
Standard C	6	1.647	5.3
Standard D	6	2.496	6.2

Inter-analyse	n	moyenne (E)	cv (%)
Standard B	4	0.752	7.1
Standard C	4	1.26	10.1
Standard D	4	1.98	6.3

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 98.2 %.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 96.6 %.

10.4. Sensibilité analytique

La Sensibilité analytique – définie comme concentration apparente de l'analyte qui peut être distinguée du calibre zéro – est 1.0 IU/ml.

10.5. Interférence

Aucune interférence n'a été observée sur des sérums hémolytiques, lipémiques ou ictériques pour des concentrations allant jusqu' à 10 mg/ml d' hémoglobine, 30 mg/ml de triglycérides et 10 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

Une contamination bactérienne ou des cycles gel-dégel répétés du spécimen peuvent affecter les valeurs d'absorption. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.

- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT :	Dans la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique lors du contact avec la peau et les membranes muqueuses !
AVERTISSEMENT :	L'acide sulfurique irrite les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. Lors du contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Mesures d'élimination

Les résidus de réactifs et des préparations sont considérés comme de déchets potentiellement dangereux. L'élimination de ces déchets est soumise à des réglementations nationales et locales. Contacter les autorités locales ou les sociétés spécialisées pour obtenir des conseils sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION DE COMMANDES

Numéro de Produit : TOXG 0460 Toxoplasma gondii IgG-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii è un genere di protozoo parassita intracellulare presente negli organi e tessuti di tutti i mammiferi (ed anche degli uccelli), compreso l'uomo. Ospite definitivo e riserva naturale dell'infezione è il gatto. Nel felino si completa, nell'epitelio intestinale, sia il ciclo di sviluppo asessuale che quello sessuale, in conseguenza del quale avviene la liberazione attraverso le feci di una grande quantità di oocisti infettanti.

L'infezione viene trasmessa per via orale mediante cibi poco cotti o carni crude, contenenti le oocisti. Il parassita nel gatto e in tutti gli altri ospiti intermedi attraversa l'epitelio intestinale, si diffonde per via ematica o linfatica e penetra all'interno dei vacuoli di diversi tipi di cellule, come macrofagi, epatociti, fibroblasti etc, dove si riproduce per via asessuale. Questa fase di attività extraintestinale del parassita rappresenta la fase acuta della malattia. La reazione immunitaria incomincia con la produzione degli anticorpi specifici. A questo punto il parassita forma cisti localizzate nei visceri, in particolare nel tessuto muscolare e nel sistema nervoso centrale. La forma cistica rappresenta la fase di resistenza cronica al sistema immunitario dell'ospite. L'infezione è ampiamente diffusa nell'uomo e negli animali, generalmente asintomatica, salvo l'alto potere patogeno per gli embrioni, dovuta alla trasmissione transplacentare. La gravità del danno fetale è direttamente proporzionale all'età gestazionale al momento dell'infezione: quanto è più precoce l'infezione gravidica tanto più grave sarà il danno fetale.

Occasionalmente i sintomi possono variare da una malattia benigna simile alla mononucleosi (febbre, abbattimento del sensorio, linfoadenopatia), fino alla malattia disseminata conclamata con gravi lesioni al cervello ed agli occhi, ai muscoli, fegato e polmone. Nei casi più gravi si può giungere ad exitus, frequentemente nei malati immunocompromessi (AIDS). La malattia può avere recidive, in seguito alla diminuzione delle difese immunitarie.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosi	generalmente asintomatica occasionalmente febbre, abbattimento del sensorio, linfoadenopatia alto potere patogeno per gli embrioni	Trasmissione: orale; contatto con feci contaminati cibi poco cotti o carni crude

Diagnosi

- PCR
- Sierologia: ELISA, immunofluorescenza indiretta IFA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Toxoplasma gondii* IgG ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per *Toxoplasma gondii* nel siero o plasma (cittrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgG per *Toxoplasma gondii* si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del *Toxoplasma gondii*. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgG umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il *Toxoplasma gondii* di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del *Toxoplasma gondii* (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del *Toxoplasma gondii*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Toxoplasma gondii* anti IgG**:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgG umani, coniugati a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.

- **Toxoplasma gondii IgG Standards***:** 4 flaconi, contenenti 2 ml, pronti all'uso

Standard A:	0	IU/ml; tappo blu
Standard B:	50	IU/ml; tappo verde
Standard C:	100	IU/ml; tappo giallo
Standard D:	200	IU/ml; tappo rosso

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del *Toxoplasma gondii*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Coniugato *Toxoplasma gondii* IgG

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgG umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.3. Standards

I flaconi contengono 2.0 ml di soluzione Standard pronta all'uso con le seguenti concentrazioni:

Standard A:	0	IU/ml
Standard B:	10	IU/ml
Standard C:	100	IU/ml
Standard D:	200	IU/ml

Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4. Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (cittrato) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

Per pazienti con probabili concentrazioni superiori allo Standard D (200 IU/ml) i campioni devono essere ulteriormente diluiti dopo la diluizione descritta sopra 1+1. Es. 100µl della prima diluizione + 100µl tampone diluente IgG (Fattore di diluizione: 2).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre.

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
4 pozzetti	(z.B. B1, C1, etc)	per gli Standards A, B, C e D.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl degli standards A B C D e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.

5. Pipettare 100µl di Coniugato Toxoplasma gondii anti-IgG in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$) al buio.**
10. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni un'altra volta come descritto in 7.1 e di ripetere il test.
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) in **A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare la **media delle assorbanze**.

9. Risultati

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Assorbanza < **0.100**
- **Standard A** in B1: Assorbanza < **0.200**
- **Standard B** in C1: Assorbanza > **0.300**
- **Standard C** in D1: Assorbanza > **0.500**
- **Standard D** in E1: Assorbanza > **1.000**

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

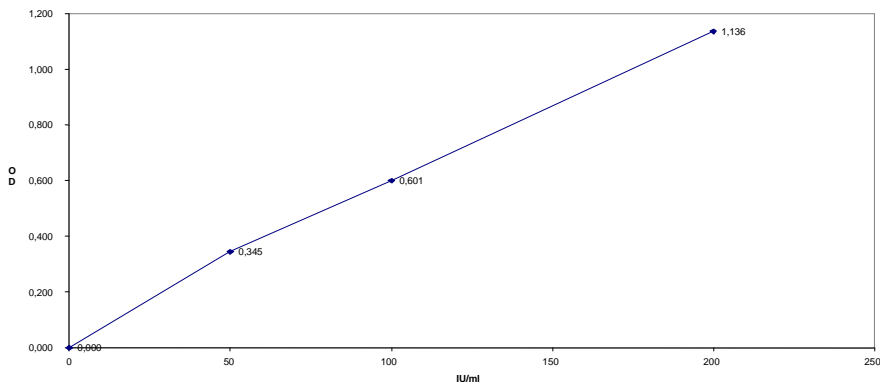
Per ottenere i **risultati quantitativi in IU/ml**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli Standards A, B, C, e D sull'asse della Y e ponendo le concentrazioni (0, 50, 100, 200 IU/ml) sull'asse della X su cui tracciare la curva standard.

Traendo i risultati da questa curva standard vanno inseriti i valori medi delle assorbanze dei campioni di ogni singolo paziente.

*Attenzione: I risultati dei campioni diluiti due volte devono essere moltiplicati con il fattore di diluizione !
(Diluizione 1+1; fattore di diluizione: 2)*

Tutti i programmi per computer commercializzati sono utilizzabili per calcolare ed interpretare i risultati.

9.2.1 Tipica curva standard



9.3. Interpretazione dei risultati

Gli intervalli in cui i valori sono normali per questo ELISA devono essere stabiliti da ogni singolo laboratorio basandosi sulla loro popolazione relativa all'area geografica servita.

I seguenti risultati possono considerarsi indicativi:

- Reattivo:** >35 IU/ml
- Dubbio:** 30 – 35 IU/ml
- Non-reattivo:** <30 IU/ml

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Standard B	6	0.978	5.7
Standard C	6	1.647	5.3
Standard D	6	2.496	6.2

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Standard B	4	0.752	7.1
Standard C	4	1.26	10.1
Standard D	4	1.98	6.3

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a 98.2 %.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a 96.6 %.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed iterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 30 mg/mL di trigliceridi e 10 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: TOXG0460 Toxoplasma gondii IgG-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

El *Toxoplasma gondii* es un parásito de tejido que se presenta en mamíferos. Se trata de parásitos intracelulares en cuyo ciclo de vida se distinguen una fase sexual y una fase asexual. El huésped principal es el gato (multiplicación sexual), el huésped secundario es el hombre (multiplicación asexual). Como huésped intermediario se conocen más de 200 géneros de aves y mamíferos. En todos los órganos se pueden encontrar quistes con estadios de la multiplicación asexual. Una multiplicación adicional se puede producir en la pared intestinal del gato. Los gatos infectados segregan oocitos con mucha frecuencia con las heces siendo muy resistentes a las influencias del medioambiente sobreviviendo varios años. La infección se produce por ingestión oral de quistes en carne cruda o poco cocida o por ingestión de oocitos de las heces de los gatos.

Se liberan 8 esporocitos después de la ingestión que pueden infiltrar la pared intestinal para infectar a células del sistema retículo endotelial donde se dividen en 16 a 32 células hijas (endo- o taquicoitas). Estas infectan a otras células humanas lo que produce daños en el corazón, en la musculatura del esqueleto, en el sistema nervioso, en el hígado, en la placenta, etc.. La multiplicación se para cuando comienza la respuesta inmunitaria. Las bradi- o citocitas sobreviven durante años en el tejido donde se forman pseudoquistes infecciosos que no dañan al huésped. Una reinfección endógena después de un trastorno del sistema inmunitario es posible.

El *Toxoplasma gondii* es de distribución mundial. La infestación de la población aumenta con la edad y llega al 70 % entre las personas de 60 a 65 años. La prevalencia depende mucho de la región geográfica, del estatus socioeconómico y de los hábitos alimenticios. Por regla general la infección post-natal se desarrolla asintomática, por lo demás se encuentra sobre todo una toxoplasmosis de los nódulos linfáticos. El agente patógeno puede contagiarse al feto a través de la placenta, lo cual lleva a graves daños fetales si la primoinfección se produce durante el embarazo. Por esta razón se recomienda excluir las infecciones primarias. En más del 98% la ausencia de anticuerpos IgM excluye una primoinfección de la embarazada. En el neonato una detección mínima de anticuerpos IgM es suficiente para confirmar una toxoplasmosis congénita porque el IgM de la madre, al contrario que el IgG, no puede traspasar la placenta. Resultados falsamente positivos son posibles en casos donde el neonato no desarrolla títulos de anticuerpos detectables.

Especies	Vía de transmisión	Síntomas	Complicaciones
Toxoplasma gondii	Ingestión oral de los agentes patógenos	Por regla general asintomático, pocas veces una linfadenopatía, fiebre, mialgias	Primoinfección durante el embarazo → infección congénita del feto
	Ingestión directa de los oocitos (gato) o de los quistes con carne cruda o no bien cocida	Después de una infección trans-placentar: hidro- u microcefalia, coriorretinitis, calcificación intracraneal	Reactivación (VIH)

Infecciones pueden ser detectadas por:

- PCR
- Inmunofluorescencia indirecta
- Serología: Detección de anticuerpos a través de ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima de Nova Tec es para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Toxoplasma gondii* en suero o plasma (citato) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cuantitativa de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii* se basa en la técnica del ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de *Toxoplasma gondii*. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgG anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgG) recubiertas de antígeno de *Toxoplasma gondii*:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Toxoplasma gondii*, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgG de la muestra***:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.

- **Conjugado IgG anti-humano (Toxoplasma gondii)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa; color azul; tapa negra.
 - **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
 - **Soluciones IgG de estándar (Toxoplasma gondii)***:** 4 botellas de 2 ml, listas para ser utilizadas:

Estándar A:	0	IU/ml; tapa azul
Estándar B:	50	IU/ml; tapa verde
Estándar C:	100	IU/ml; tapa amarilla
Estándar D:	200	IU/ml; tapa roja
- * contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir
 ** contiene 0.2% Bronidox L
 *** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgG anti-humano (Toxoplasma gondii)

La botella contiene 20ml de una solución de IgG anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante azul inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.3. Estándar

Las botellas contienen 2.0 ml de solución estándar lista para ser utilizada. Las concentraciones de las soluciones estándar según el tercer estándar internacional de la OMS (3rd) son:

Estándar A: 0 IU/ml
 Estándar B: 50 IU/ml
 Estándar C: 100 IU/ml
 Estándar D: 200 IU/ml

Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

6.4. Tampón de dilución de IgG para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-70...-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgG, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

Muestras donde se espera una concentración de antitoxinas más alta de la concentración del estándar D (200 IU/ml) se tendrá que diluir como se describe arriba 1+1, en general 100 µl de la muestra diluida + 100µl de diluyente IgG para la muestra (factor de dilución: 2).

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(e.G. A1)	para el blanco,
4 pocillos	(e.G. B1, C1, etc.)	para los estándares A, B, C y D.

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente. Se recomienda de llevar pruebas de control positivo o negativo con cada ensayo.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

1. Pipetear 100 µl de estándares y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados errónamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado anti-IgG (*Toxoplasma gondii*) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C)**. Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C)**.

10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

Nota: *Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgG 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- | | | |
|---------------------|-------|--------------------------|
| ▪ Blanco | en A1 | extinción < 0.100 |
| ▪ Estandar A | en B1 | extinción < 0.200 |
| ▪ Estandar B | en C1 | extinción > 0.300 |
| ▪ Estandar C | en D1 | extinción > 0.500 |
| ▪ Estandar D | en E1 | extinción > 1.000 |

Estandar A < Estandar B < Estandar C < Estandar D

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Cálculo del valor de la medición

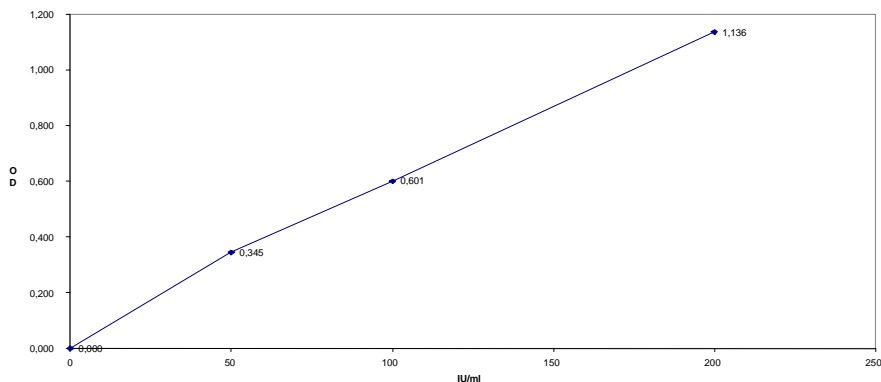
Para obtener resultados cuantitativos en IU/ml se tiene que establecer una curva estándar con los valores de extinción (eje y) de los 4 estándares A, B, C y D contra sus respectivas concentraciones (0, 50, 100, 200 IU/ml) (eje x).

Con esta curva estándar se pueden ver los resultados por el promedio de las extinciones de las pruebas de los pacientes.

Comentario: *Los resultados adicionales (p.e. 1+1) de muestras diluidas tienen que ser multiplicados con el factor de dilución (dilución 1+1; factor de dilución: 2)*

Existen programas comercializados que posibilitan un cálculo automático de curvas estándar y de los resultados. Para calcular la curva estándar se puede elegir las regresiones lineales o las funciones de punto a punto.

9.2.1 Curva de estándar típica



9.3. Interpretación de los resultados

Las normas para los resultados del ELISA tienen que estar establecidas con el colectivo respectivo de los pacientes en el área del laboratorio.

Estos son los datos normativos

Reactivo:	>35	IU/ml
Zona intermedia:	30 – 35	IU/ml
No-reactivo:	<30	IU/ml

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

<u>Intra ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio</u>	<u>CV (%)</u>
Estándar B	6	0.978	5.7
Estándar C	6	1.647	5.3
Estándar D	6	2.496	6.2

<u>Inter ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio</u>	<u>CV (%)</u>
Estándar B	4	0.752	7.1
Estándar C	4	1.26	10.1
Estándar D	4	1.98	6.3

10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de 98.2 %.

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de 96.6 %.

10.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ensayo esta definida como la concentración más pequeña que se puede distinguir del estándar cero. Esta es de 1.0 IU/ml.

10.5. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml para hemoglobina, de 30 mg/ml para triglicéridos y de 10 mg/ml para bilirrubina.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.

- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos






Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: TOXG0460 Toxoplasma gondii IgG-ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

- A. Balsari et al. ELISA for Toxoplasma antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests. *J. Clin. Pathol.*, 33: 640 (1980)
- M.H. Beaman, R.E. McCabe, S-Y. Wong, J.S. Remington, *Toxoplasma gondii*, Inc: Principles and Practice of Infectious Diseases, G.L. Mandell, J.E. Bennet, R. Dolin, eds., Churchill Livingstone Publ., Fourth edition, p. 2455-2475 (1995)
- A. Bondiolo et al. ELISA for Toxoplasma antibodies. Inc: Immunoenzyme Assay Techniques, R. Malvano ed.,M. Nijhoff Publ. (1980)
- M.E. Camargo et. al. Immunoglobine G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Inf. Immun.*, 21:55 (1978)
- Y. Carlier et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. *Bull. World Health Organization*, 58 (1): 99 (1980)

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles/ Legenda/ Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CAL	Calibrator/ Kalibrator/ Etalon/ Calibratore/ Calibrador
DIL G	Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Tampon de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Toxoplasma gondii IgG-ELISA

Assay Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and standards on the form supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Sample (diluted 1+100)
Standard A	-	100µl	-	-	-	-
Standard B	-	-	100µl	-	-	-
Standard C	-	-	-	100µl	-	-
Standard D	-	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution						
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution						
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark						
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)						

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

TOXG0460engl,dt,fr,it,es06102010-CR