

## NovaLisa™

# Toxoplasma gondii

## IgM $\mu$ -capture– ELISA

CE 0483

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

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* in Humanserum oder Plasma

Enzyme immunoassay pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre l' *Toxoplasma gondii* en sérum humain ou plasma

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

Enzimoimmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra *Toxoplasma gondii* en suero o plasma humano

### Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 12
Français:	Page	à
Italiano:	da Pagina	13 a 17
Espanol:	Página	18 a 23

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía	Page / Seite / Page / Pagina / Página	26
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	27
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ Pagina / Página	28

---

Product Number: TOXM0460 (96 Determinations)

---

## 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 socioeconomic 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	Acquired Toxoplasmosis: lymphadenopathy, Chorioretinitis Congenital Toxoplasmosis: hydrocephalus, Microcephaly, intracranial calcifications, chronical chorioretinitis	Direct: ingestion of oocysts (cats) by food, including water contaminated by feces of cats or contaminated soil. Indirect: Ingestion of cysts by eating raw or insufficiently cooked meat, esp. pork. Congenital infection of the fetus.

Infection may be identified by:

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

## 2. INTENDED USE

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

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

The *Toxoplasma* IgM ELISA is an IgM-µ-capture ELISA.

Microtiter strip wells are precoated with anti-human IgM-class antibodies to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material a complex of antigen and horseradish peroxidase labelled *Toxoplasma gondii* antibody is added. This complex binds to the captured *Toxoplasma* specific IgM antibodies. This immune complex is visualized with Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of *Toxoplasma gondii*-specific IgM antibody 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

- **Microtiterplate (IgM):** 12 breakpart 8-well snap-off strips coated with anti-human IgM-class antibodies; in resealable aluminium foil.
- **Sample Diluent\*\*:** 1 bottle containing 100 ml of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml ready to use sulphuric acid, 0.2 mol/l; 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.
- **T. gondii Conjugate lyoph.:** 1 vial containing lyophilized conjugate comprising of a complex of Toxoplasma antigen-monoclonal antibody anti-P30 conjugated with horseradish peroxidase (HRP).
- **T. gondii Conjugate Diluent:** 1 bottle containing 14 ml of a ready to use buffer for conjugate dilution containing monoclonal anti-toxoplasma P30 conjugated with HRP and stabilizers; pH 7.2 ± 0.2; coloured red, white cap.
- **TMB Substrate:** 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use, yellow cap.
- **T. gondii IgM Cut Off Control\*\*:** 1 vial containing 3.0 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **T. gondii IgM Positive Control\*\*:** 1 vial containing 2.0 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **T. gondii IgM Negative Control\*\*:** 1 vial containing 2.0 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

\* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 3 empty, labelled vials (white with white cap) for storage of aliquots of reconstituted conjugate at -20°C
- 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 controls 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 anti-human IgM-class antibodies. 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 Conjugate

Reconstitute the lyophilized vial with 5 ml of Conjugate Diluent. It is recommended to add the volume of Conjugate Diluent into the vial, close the cap, wait 15 min at room temperature and gently mix in order to avoid foaming. Transfer the reconstituted solution into the Conjugate Diluent vial. The final volume will be 14 ml. The reconstituted complex is stable for 2 months at +2...+8°C.

After first use it is recommended to aliquot the reconstituted conjugate into the supplied vials (s. 4.2.) and store the aliquots at -20°C. Aliquot size should be adapted to the conjugate volume usually required for one test run in the particular lab. This is to avoid repeated freezing and thawing. In general storage at -20°C is possible in polypropylene (PP) vials like Eppendorf micro test tubes. At -20°C the reconstituted conjugate is stable until the expiry date. Avoid repeated freezing and thawing.

### 6.3. Controls

The vials labelled with Positive Control, Negative Control and Cut off Control contain a ready to use control solution. They have to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.4. 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 will keep for 5 days if stored 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 Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 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. Prepare the required volume of Washing Solution and T. gondii Conjugate (see "6. Reagent Preparation").

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

*Controls and patient samples should be determined 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 100 µl controls 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 300 µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. 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 100 µl T. gondii Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 30 min at room temperature (20 to 25°C) in the dark.**
10. Dispense 100 µl 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 with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

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. Run Validation Criteria

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

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

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

### 9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

### 9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

#### 9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example:  $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	9-11	NTU
Negative:	<9	NTU
Positive:	>11	NTU

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>mean [NTU]</b>	<b>Cv%</b>
positive Sera	12	13,25	8,8 %
high positive Sera	11	48,06	8,9 %

<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>mean [OD]</b>	<b>VK%</b>
positive Sera	20	0,429	5,6 %
high positive Sera	20	1,725	3,2 %

## 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 >95%.

## 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 95.2 %.

## 10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 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.

To estimate (primary or recurrent) *T. gondii* infections by serology it is advised to test serum pairs. The second pair can be drawn 14 to 21 days after the first. Each serum pair should be tested at the same day and in the same test to allow interpretation of significant differences in antibody levels. It is advised to perform a combination of IgM, IgA and IgG testing.

## 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:** Sulfuric 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: TOXM0460

Toxoplasma gondii IgM  $\mu$ -capture 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 Sporozysten 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 ungebremst 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
<i>Toxoplasma gondii</i>	orale Aufnahme der Erreger  direkte Aufnahme der Oozysten (Katze) indirekte Aufnahme von Zysten aus ungenügend gekochtem Fleisch	in der Regel keine, nur selten Lymph-adenopathie, Fieber, Myalgien  nach transplazentarer Infektion: Hydro- u. Mikrozephalus, Chorioretinitis, intrakranielle Verkalkungen	Erstinfektion in der Schwangerschaft → kongenitale Infektion des Fötus  Reaktivierung (HIV)	PCR  Immunfluoreszenz  Serologie

Nachweis:

- PCR
- Indirekte Immunfluoreszenz
- Serologie: Antikörnernachweis 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* IgM  $\mu$ -capture ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von gegen *Toxoplasma gondii* gerichtetem spezifischen IgM beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Der *T. gondii* IgM ELISA ist ein  $\mu$ -capture ELISA. Mikrotiterplatten als Festphase sind dafür mit anti-human-IgM Antikörpern beschichtet, um entsprechende Antikörper der Probe zu binden. Überschüssiges Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Nach Zugabe eines Komplexes aus Antigen und Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertem Antikörper bindet dieser an die immobilisierten *Toxoplasma* spezifischen IgM-Antikörper. Die entstanden 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 450 nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Anti-human-IgM beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit anti-human-IgM Antikörpern, in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/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 Konjugat lyoph.:** 1 Fläschchen mit lyophilisiertem Konjugat bestehend aus einem Komplex aus Toxoplasma Antigen-Monoklonaler Antikörper Anti-P30 konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP).
- **Toxoplasma gondii Konjugatverdünner:** 1 Flasche mit 14 ml Puffer zur Konjugatverdünnung mit monoklonalem Anti-Toxoplasma P30 konjugiert mit HRP und Stabilisatoren, gebrauchsfertig; rot gefärbt, weiße Verschlusskappe.
- **TMB-Substrat:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Kappe.
- **T. gondii IgM Cut Off Kontrolle\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml einer Lösung zur Bestimmung des Cut Off; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe.
- **T. gondii IgM Negativ-Kontrolle\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml einer Kontrolllösung; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe.
- **T. gondii IgM Positiv-Kontrolle\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml einer Kontrolllösung; gebrauchsfertig; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe.

\* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

\*\* enthält 0.1 % Kathon

### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 3 leere, etikettierte Flaschen (weiß mit weißem Deckel) zur Lagerung des rekonstituierten, aliquotierten Konjugates bei -20°C.
- 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 anti-human-IgM Antikörpern 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 Konjugat

Für die Rekonstitution das Lyophilisat im Originalfläschchen mit 5 ml Konjugatverdünner lösen und 15 min. bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Das gelöste Konjugat in das Fläschchen des Konjugatverdünners überführen und vorsichtig mischen. Das Endvolumen des verdünnten Konjugates beträgt 14 ml. Die rekonstituierte Lösung ist bei +2...+8°C zwei Monate stabil.

Es wird empfohlen das gelöste Konjugat nach der ersten Verwendung in den mitgelieferten Fläschchen (s. 4.2.) portioniert einzufrieren. Die Portionsgröße sollte dem Konjugatvolumen entsprechen, das bei durchschnittlichen Messungen im jeweiligen Labor benötigt wird. Hierdurch wird wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden. Zur Lagerung bei -20°C können grundsätzlich auch andere Gefäße aus Polypropylen (PP) wie z.B. Eppendorf Mikro Test Tubes verwendet werden. Bei Lagerung bei -20°C ist das rekonstituierte Konjugat bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

### 6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. 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. 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 frische 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

Die Flasche 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 humane Serum- oder Plasmaproben (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). Wieder aufgetaute 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 Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

## 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. Benötigte Mengen Waschlösung und T. gondii Konjugat vorbereiten (siehe „6. Vorbereitung der Reagenzien“).

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen.

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

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.  
Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.  
Den Brutschrank auf  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen 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 ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschpuffer 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 Fliesspapier 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 verdünntes Toxoplasma gondii Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 30 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-Substrat 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 mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*
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 Kontrollen 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**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktion **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktion > **Cut-off**

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

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

*Beispiel:  $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$*

*$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$*

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

#### 9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel:  $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

## 10. TESTMERKMALE

### 10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert [NTU]	VK%
positives Serum	12	13,25	8,8 %
hoch positives Serum	11	48,06	8,9 %

Intraassay	n	Mittelwert [OD]	VK%
positives Serum	20	0,429	5,6 %
hoch positives Serum	20	1,725	3,2 %

### 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 > 95 %.

### 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 95,2 %.

### 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 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.

Zur Diagnose (Primär- oder Reinfektion) einer *Toxoplasma gondii* Infektion mit Hilfe der Serologie wird die Testung von Serumpaaren empfohlen. Die zweite Probe sollte 14 bis 21 Tage nach der ersten genommen werden. Beide Proben sollten am gleichen Tag mit demselben Test gemessen werden, um bestimmen zu können, ob ein signifikanter Anstieg des Antikörperlevels vorliegt. Es wird eine kombinierte Testung für IgA, IgG und IgM empfohlen.

## 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 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:** 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: TOXM0460

Toxoplasma gondii IgM  $\mu$ -capture ELISA (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUZIONE

*Toxoplasma gondii* è un parassita intracellulare piccolo con un ciclo vitale avente una fase sessuale ed una asessuale. Lo sviluppo sessuale è ristretto alle cellule intestinali (probabilmente esclusivamente) di gatti; le oocisti formate vengono espulse e grazie alla loro resistenti pareti cellulari esse possono essere infettive anche in condizioni svantaggiose per almeno 1 anno. Sia animali che uomini sono ospiti intermedi per la proliferazione asessuale di *T. gondii*: i parassiti ingeriti proliferano esplosivamente all'interno delle cellule ospiti con conseguente lisi cellulare. Si distribuiscono per tutto il corpo attraverso il sistema circolatorio e linfatico e possono infettare ogni tipo cellulare. Nel muscolo e nel cervello si formano cisti cellulari che sono sferici e ca. 5-100 µm nel diametro. Le cisti sono virtualmente immortali nell'ospite intermedio.

*Toxoplasma gondii* è il parassita più comune del genere umano, ma la sua distribuzione (7-80%) dipende fortemente dall'area geografica, dallo stato socioeconomico e dalle usanze alimentari. L'infezione causa soltanto raramente la toxoplasmosi e normalmente non si notano sintomi clinici. L'infezione può però causare problemi severi in persone immunosoppressi e per il feto. Dato che soltanto l'infezione primaria durante la gravidanza può essere pericoloso e anche fatale per il feto (la probabilità di infezione congenitale è superiore al 50%), si deve escludere precocemente la possibilità di una infezione.

In donne gravide in oltre 98% dei casi l'assenza di anticorpi IgM esclude la possibilità di una infezione recente. In neonati la presenza di anti-toxoplasma IgM da sola è sufficiente per confermare una toxoplasmosi congenitale, dato che IgM materno, a differenza di IgG, non passa la barriera della placenta. Ma un numero significativo di bambini infetti non sviluppa livelli rilevabili di IgM e risultano pertanto come falsi negativi. In pazienti immunosoppressi la toxoplasmosi causa severe complicazioni soprattutto per la re-attivazione di una infezione latente preesistente.

Specie	malattia	Sintomi	Meccanismo di infezione
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosi	Toxoplasmosi acquisite: linfadenopatia, corioretinite Toxoplasmosi congenitale: idrocefalia, microcefalia, calcificazioni intracraniali, corioretinite cronica.	Diretto: ingestione di oocisti (gatti) con alimenti, incluso acqua contaminate da feci di gatti o suolo contaminato. Indiretto: Ingestione di cisti mangiando carne cruda o poco cotta, specialm. Suina. Infezione congenitale del feto.

L'infezione può essere identificata da:

- PCR
- Immunofluorescenza indiretta (IIF)
- Sierologia: Rilevamento di anticorpi con ELISA

## 2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Toxoplasma gondii* IgM µ-capture ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per *Toxoplasma gondii* nel siero o plasma (citrate) umano.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgG per *Toxoplasma gondii* si basa sul principio ELISA.

Il test *Toxoplasma* IgM ELISA è un test IgM-µ-capture ELISA.

Le strisce microtiter sono ricoperti da anticorpi anti-umani di classe IgM che legano i corrispondenti anticorpi presenti nel campione. Dopo il lavaggio dei pozzetti per rimuovere il materiale non legato, un complesso formato dall'antigene e l'anticorpo a *Toxoplasma gondii* legato alla perossidasi di rafano viene aggiunto. Questo complesso si lega agli anticorpi IgM specifici al *Toxoplasma* immobilizzati (captati). 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 IgM 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 (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi anticorpi anti-umano di classe IgM; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente \*\*:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.

- **T. gondii coniugato liofill.:** 1 flacone contenente il coniugato liofillizzato che consiste in un complesso di Toxoplasma antigene – anticorpo monoclonale anti-P30 coniugato alla perossidasi di rafano (HRP).
- **Diluyente del T. gondii coniugato:** 1 bottiglia contenente 14 ml di un tampone pronto all'uso per la diluizione del coniugato contenente anti-toxoplasma monoclonale P30 coniugato alla HRP e stabilizzatori; pH 7.2 ± 0.2; colore rosso, tappo bianco.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Toxoplasma IgM Controllo positivo\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Toxoplasma IgM Controllo Cut-off\*\*:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Toxoplasma IgM Controllo negativo\*\*:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

\* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

\*\* contiene 0.1 % Kathon

#### 4.2. Accessori forniti

- 3 tubetti vuoti, etichettati (bianchi con tappo bianco) per la conservazione a -20°C degli aliquoti del coniugato reconstituito
- 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 anticorpi anti-umano della classe IgM. 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 IgM

Ricostituire il tubetto con il coniugato liofillizzato con 5 ml del diluente del coniugato. Si raccomanda di aggiungere il volume del coniugato al tubetto, di chiudere il tappo e di aspettare 15 minuti a temperatura ambiente e di mescolare cautamente per evitare la formazione di schiume. Trasferire la soluzione ricostituita nel tubetto per il coniugato diluito. Il volume finale sarà di 14 ml. Il complesso ricostituito è stabile per 2 mesi tra +2...+8°C.

Dopo il primo uso si raccomanda di aliquotare il coniugato ricostituito nei tubetti forniti (v. 4.2) e di conservare gli aliquoti a -20°C. I volumi degli aliquoti devono essere adatti al volume del coniugato usualmente richiesto per un saggio nel proprio laboratorio. Questo serve per evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Generalmente la conservazione a -20°C è possibile in tubetti di polipropilene (PP) tipo Eppendorf. A -20°C il coniugato ricostituito è stabile fino alla data di scadenza. Evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

#### 6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. 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

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 (citrate) 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/scongelo.*  
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).

## 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 350 µl 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. *Preparare il volume richiesto di soluzione di lavaggio e del coniugato T. gondii (vedi "6. preparazione dei reagenti").*

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

*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 di controllo 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 100 µl di coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Non esporre a fonti di luce diretta.**
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{...}25^{\circ}\text{C}$ ) 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: Valore di assorbanza < 0.100.
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < 0.200 e < cut-off.
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza 0.150 – 1.300.
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza > cut-off.

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

### 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

*Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38*

*Cut-Off = 0.38*

### 9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

---

### 10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media [OD]	CV (%)
Siero pos.	20	0.429	5.6 %
Siero pos.	20	1.725	3.2 %
Interdosaggio	n	Media [NTU]	Cv (%)
Siero pos.	12	13.25	8.8
Siero pos.	11	48.06	8.9

### 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 > 95 %.

### 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 95.2 %.

## 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0.2 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.

Per stimare l'infezione di *T. gondii* (primaria o ricorrente) dalla sierologia di avverte di esaminare il test siero in doppio. Un secondo campione può essere prelevato 14 a 21 giorni dopo il primo. Ogni coppia di siero deve essere analizzata allo stesso giorno e con lo stesso test per permettere l'interpretazione di differenze significative nei livelli anticorpali. Si raccomanda di eseguire una combinazione di test per IgM, IgA e IgG.

## 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: TOXM0460 Toxoplasma gondii IgM  $\mu$ -capture ELISA (96 determinazioni)

## 1. INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular de pequeño tamaño, cuyo ciclo de vida tiene una fase sexual y otra asexual. La fase de desarrollo sexual está restringida a las células intestinales de los gatos (probablemente de forma exclusiva); los oocitos que se hayan formado son excretados y debido a su resistente pared celular mantienen su capacidad infectiva en condiciones adversas durante al menos 1 año. Los animales y el hombre son huéspedes intermediarios durante la fase asexual de proliferación del *T. gondii*: los parásitos ingeridos proliferarán de forma explosiva dentro de la célula huésped provocando finalmente su lisis. Tras la lisis celular se diseminan por todo el cuerpo por medio del sistema circulatorio y linfático y pueden infectar cualquier tipo de célula. Los quistes se forman en las células musculares y en el cerebro, son esféricos y miden 5-100 µm de diámetro. Los quistes en el huésped intermedio son virtualmente inmortales.

*Toxoplasma gondii* es el parásito más común en los humanos, pero su prevalencia (7-80%) depende en gran medida del área geográfica, del estatus socio- económico y de los hábitos alimenticios. La infección por toxoplasma raramente conduce a la aparición de la enfermedad y normalmente no presenta síntomas clínicos, pero puede producir problemas severos de inmunodepresión en las personas que lo padecen y en el feto.

Debido a que únicamente la infección primaria durante el embarazo puede ser peligrosa e incluso fatal para el neonato (la probabilidad de una infección congénita se encuentra alrededor del 50%) debe excluirse la aparición de una infección reciente.

Aproximadamente en el 98% de los casos de mujeres embarazadas, la ausencia de IgM excluye la posibilidad de una infección reciente. En recién nacidos la presencia temprana de anticuerpos IgM anti toxoplasma es suficiente para confirmar una toxoplasmosis congénita, ya que la IgM materna no atraviesa la placenta, y la IgG de manera poco probable. Existe un número significativo de niños infectados que no desarrollan niveles de IgM detectables y que muestran por lo tanto un resultado falso negativo. En pacientes inmunodeprimidos la toxoplasmosis causa complicaciones severas debidas principalmente a la reactivación por una infección temprana latente.

Especies	Patología	Síntomas	Mecanismo de infección
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmosis	Toxoplasmosis adquirida : linfadenopatía, coriorretinitis Toxoplasmosis congénita: hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, Coriorretinitis crónica.	Directo: ingestión de oocitos (gatos) a través de la comida, incluyendo agua contaminada con heces de gato o por contaminaciones del suelo. Indirecto: Ingestión de quistes por comer carne cruda o poco hecha, especialmente de cerdo. Infección congénita del feto.

Las infecciones pueden detectarse a través de:

- PCR
- Inmunofluorescencia indirecta (IIF)
- Serología: Detección de la producción de anticuerpos por la técnica de ELISA.

## 2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático de Nova Tec se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra *Toxoplasma gondii* en suero y plasma (citratado) humano.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii* se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). El kit *Toxoplasma* IgM ELISA es un ensayo para detección de IgM-µ por la técnica de ELISA.

Las placas están formadas por tiras de micropillos previamente recubiertos con anticuerpos anti IgM humano que se unen a los anticuerpos específicos correspondientes presentes en la muestra. Tras un paso de lavado para eliminar el material de la muestra sin unir, se añade el complejo formado por el antígeno y los anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* marcados con peroxidasa. Este complejo, se unirá a los anticuerpos IgM anti toxoplasma *gondii* capturados previamente. 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 (IgM):** 12 tiras divisibles formadas por 8 micropocillos recubiertos con anticuerpos anti IgM humana, en una bolsa de aluminio con cierre.
- **Diluyente de muestra\*\* :** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para el uso; tapón blanco.

- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para el uso; 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 de T. gondii liofilizado:** 1 vial que contiene el conjugado liofilizado, que se compone de un complejo formado por el antígeno de Toxoplasma-anticuerpo monoclonal frente al antígeno P30 conjugado con peroxidasa (HRP).
- **Diluyente del conjugado de T. gondii:** 1 botella de 14 ml de tampón listo para usar que contiene la solución para la dilución del conjugado que contiene el anticuerpo anti P30 de Toxoplasma gondii conjugado con HRP y conservantes; pH 7.2 ± 0.2; color rojo, tapón blanco.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para el uso; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (Toxoplasma)\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para el uso.
- **Control cut-off de IgM (Toxoplasma)\*\*:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para el uso.
- **Control negativo de IgM (Toxoplasma)\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para el uso.

\* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

\*\* contiene 0.1% Catón

## 4.2. Accesorios suministrados

- 3 viales identificados y vacíos (blancos con tapa blanca), para el almacenamiento a -20°C de las alícuotas del conjugado reconstituido.
- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

## 4.3. Materiales e 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 IgM anti-humano. 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 Toxoplasma gondii

Reconstituir el vial de liofilizado con 5ml del Diluyente del Conjugado. Se recomienda añadir el volumen de Diluyente del Conjugado dentro del vial de liofilizado, cerrar la tapa, dejar reposar 15 min a temperatura ambiente, y mezclar con cuidado evitando la formación de espuma. Transferir la solución así reconstituida al vial de Diluyente del Conjugado. El volumen final sera de 14 ml. El complejo reconstituido es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Se recomienda realizar alícuotas del conjugado reconstituido en los viales suministrados, tras su primera utilización (ver 4.2) y almacenar a -20°C. El tamaño de las alícuotas debería adaptarse al volumen de conjugado que se utiliza normalmente para la realización de un ensayo en cada laboratorio en particular. De esta forma se evita la congelación y descongelación repetida del conjugado reconstituido. En general, se recomienda realizar el almacenamiento a -20°C en viales de polipropileno (PP) de tipo Eppendorf. Si se almacena a -20°C, el conjugado reconstituido es estable hasta la fecha de caducidad. Evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

### 6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. 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 de 2...8°C.*

### 6.4. Diluyente de 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 apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está 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 apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está 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 (-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, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 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 elevar el número de lavados 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. Preparar el volumen requerido de Solución de Lavado y de Conjugado de *Toxoplasma gondii* (ver punto 6 sobre "Preparación de los Reactivos").

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. D1)	para el control positivo

*Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.*

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

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

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles 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 rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración

tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

*Nota:* El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!

5. Pipetar 100µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 1 h ± 5 min a 37°C.** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetear 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 30 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 IgM 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. CALCULO DE LOS RESULTADOS

---

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- |                           |            |   |
|---------------------------|------------|---|
| ▪ <b>Blanco</b>           | en A1      | extinción < <b>0.100</b>                    |
| ▪ <b>Control negativo</b> | en B1      | extinción < <b>0.200</b> y < <b>cut-off</b> |
| ▪ <b>Control cut-off</b>  | en C1 y D1 | extinción <b>0,150 – 1,30</b>               |
| ▪ <b>Control positivo</b> | en E1      | extinción > <b>cut-off</b>                  |

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

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

*Cut-off= 0,43*

### 9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción ±10% del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

### 9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

$\frac{\text{Promedio de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-unidades} = \text{NTU}]$

Ejemplo:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off : 10 NTU  
Zona intermedia: 9-11 NTU  
Negativo: <9 NTU  
Positivo: >11 NTU

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 10.1. Precisión

Inter ensayo	n	Promedio (NTU)	CV (%)
Suero pos.	12	13,25	8,8 %
Suero pos.	11	48,06	8,9 %

Intra ensayo	n	Promedio (OD)	CV (%)
Suero pos.	20	0,429	5,6 %
Suero pos.	20	1,725	3,2 %

### 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. (> 95 %).

### 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. (95,2 %).

### 10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos, de 0,2 mg/ml para bilirrubina y de 10 mg/ml hemoglobina.

*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.

Para realizar una estimación de las infecciones por *T. gondii* (primarias o recurrentes) por serología se recomienda realizar ensayos con parejas de sueros del mismo paciente. La segunda pareja de suero puede extraerse a partir del día 14 y hasta el día 21 tras la primera extracción. Cada pareja de suero de los pacientes extraídas en los dos momentos, debe testarse en el mismo día y en el mismo ensayo para permitir la interpretación de diferencias significativas en los niveles de anticuerpo. Se recomienda realizar una combinación de los ensayos frente a IgM, IgA e IgG.

## 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:** 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 l'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: TOXM0460      Toxoplasma gondii IgM  $\mu$ -capture 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/ Tabela de símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por
<b>IVD</b>	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/ Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
<b>LOT</b>	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote/ Número do Lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad/ Data de Validade
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento/ Temperatura de Armazenamento
<b>CE</b>	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE/ Marca CE
<b>REF</b>	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo/ Referência de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso/ Consultar as Instruções de Utilização
<b>MTP</b>	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca
<b>CONJ</b> <b>LYO</b>	Conjugate lyophilized/ Konjugat lyophilisiert/ Conjugué lyophilisée / Coniugato liofillizzato/ Conjugado liofilico/ Conjugado liofilizado
<b>CONJ</b>	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado/ Conjugado
<b>CONJ</b> <b>DIL</b>	Conjugate diluent/ Konjugatverdünner/ Tampon diluant pour Conjugué/ Diluente Coniugato/ Diluyente del Conjugado/ Solução de tampão para Conjugado
<b>CONTROL</b> <b>-</b>	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Siero control negativo/ Soro de controle negativo
<b>CONTROL</b> <b>+</b>	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo/ Soro de controle positivo
<b>CUT OFF</b>	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off/ Soro de controle cut-off
<b>DIL</b>	Sample diluent buffer / Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon / soluzione tampone per i campioni / solución tampón para muestras / Solução de tampão para amostras
<b>SOLN</b> <b>STOP</b>	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada/ Solução de bloqueio
<b>SUB</b> <b>TMB</b>	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB/ Solução substrato TMB
<b>WASH</b> <b>BUF</b> <b>20x</b>	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20/ Solução de lavagem concentrado 20x
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests/ Conteúdo suficiente para "n" testes

# SCHEME OF THE ASSAY

Toxoplasma gondii IgM  $\mu$ -capture ELISA

## Assay Preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.  
 Prepare the required volume of Washing Solution, T. gondii Antigen Conjugate and TMB Substrate Solution

## Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100 $\mu$ l	-	-	-
Positive control	-	-	100 $\mu$ l	-	-
Cut-off control	-	-	-	100 $\mu$ l	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 $\mu$ l
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300 $\mu$ l of washing solution					
Conjugate	-	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37°C</b> Wash each well three times with 300 $\mu$ l of washing solution					
TMB Substrate	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>Incubate for 30 min at room temperature in the dark</b>					
Stop Solution	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
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](http://www.NovaTec-ID.com)

TOXM0460engl,dt,it,es-18012012-CR