

Toxo IgM

**“Capture” Enzyme Immuno Assay
(ELISA) for the determination of
IgM antibodies to Toxoplasma gondii
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Toxo IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* or *T.gondii* in human plasma and sera with the "capture" system.

The device is intended for the follow-up of *T.gondii* infected patients and for the monitoring of risk of neonatal defects due to *T.gondii* infection during pregnancy.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite that is probably capable of infecting all species of mammals, including man.

The detection of IgM antibodies to *T.gondii* is particularly helpful for the diagnosis of acute infections in "risk" individuals, in association with AIDS, organ transplantation and pregnancy.

As most of *T.gondii* infections are mild or asymptomatic in otherwise healthy individuals, the detection of *T.gondii* specific IgM antibodies, in absence of detectable specific IgG, has become important for the monitoring of acute infections in pregnant women, as the parasite can lead to severe birth defects.

Moreover, as *T.gondii* infections are most severe in immunocompromised patients, where the disease can be fatal, acute infections due to this parasite have to be distinguished from other disorders.

Recently developed IgM capture assays provide the clinician with a helpful and reliable test, not affected by the rheumatoid factor as it happens to be in classic sandwich tests.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the principle of "IgM capture" where IgM class antibodies in the sample are first captured by the solid phase coated with anti hIgM antibody.

After washing out all the other components of the sample and in particular IgG antibodies, the specific IgM captured on the solid phase are detected by the addition of a preparation of inactivated *T.gondii*, labeled with a specific monoclonal antibody conjugated with peroxidase (HRP).

After incubation, microwells are washed to remove unbound conjugate and then the chromogen/substrate is added.

In the presence of peroxidase the colorless substrate is hydrolysed to a colored end-product, whose optical density may be detected and is proportional to the amount of IgM antibodies to *T.gondii* present in the sample.

A system is described how to control whether the positivity shown by a sample is true or not (Confirmation Test), helpful for the clinician to make a correct interpretation of results.

D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with anti human IgM affinity purified goat antibody, in presence of bovine proteins.

Plates are sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 2..8°C.

2. Negative Control: CONTROL

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains 1% human plasma negative for *T.gondii* IgM, 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The negative control is colorless.

3. Positive Control: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Ready to use control. It contains 1% human plasma positive for *T.gondii* IgM, 2% casein, 10 mM Tris-citrate buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The positive control is green colour coded.

4. Calibrator: CAL ...ml

N° 1 lyophilized vial. To be dissolved with EIA grade water as reported in the label. It contains anti *T.gondii* IgM at 200 WHO IU/ml +/-10% (3rd WHO International Standard for *T.gondii* IgG&IgM), fetal bovine serum, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and ProClin 300 0.045% as preservatives.

Note: The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.

5. Lyophilized *T.gondii* Ag: AG TOXO

N° 6 lyophilized vials.

The vials contain lyophilized gamma ray inactivated *Toxoplasma gondii* in a protein buffer. The solution contains 2% bovine proteins, 10 mM Tris HCl buffer pH 6.8+/-0.1, 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300. To be dissolved with 1.9 ml of Antigen Diluent as reported in the specific section.

6. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300

7. Enzyme conjugate: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. 20x concentrated solution of a *T.gondii*-specific monoclonal antibody, labeled with HRP and diluted in a protein buffer containing 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives.

8. Antigen Diluent : AG DIL

n° 1 vial of 16 ml. Protein buffer solution for the preparation of the Immunocomplex. The solution contains 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives. The reagent is code colored with 0.01% red alimentary dye

9. Specimen Diluent : DILSPE

2x60.0 ml/vial. Proteic buffered solution for the dilution of samples. It contains 2% casein, 10 mM citrate buffer pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

The reagent is color coded with 0.01% blue alimentary dye.

10. Chromogen/Substrate : SUBS TMB

1x16ml/vial. It contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 0.03% tetra-methyl-benzidine (TMB), 0.02% hydrogen peroxide (H₂O₂) and 4% dimethylsulphoxide.

Note: To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.

11. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. It contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

12. Plate sealing foils n° 2

13. Package insert n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (1000 ul, 100 ul and 10 ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator (dry or wet), set at +37°C (+/-0.5°C tolerance)..
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Chromogen (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
7. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels. A study conducted on an opened kit did not pointed out any relevant loss of activity up to six 6 uses of the device and up to 3 months.
11. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
13. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological

substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min..

14. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.

15. The Sulphuric Acid is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water

16. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND WARNINGS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. Bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.
3. Haemolysed ("red") and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
4. Sera and plasma can be stored at +2°...+8°C in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
5. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8u filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the container. Check that the desiccant has not turned dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Dia.Pro's customer service. Unused strips have to be placed back into the aluminum pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2°..8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Calibrator:

Add the volume of ELISA grade water reported on the label to the lyophilized powder. Let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Important Note: The solution is not stable. Store the Calibrator frozen in aliquots at -20°C .

Wash buffer concentrate:

The whole content of the concentrated solution has to be diluted 20x with bidistilled water and mixed gently end-over-end before use. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at $+2..8^{\circ}\text{C}$.

Ag/Ab Immunocomplex:

Proceed carefully as follows:

1. Dissolve the content of a lyophilized vial with 1.9 ml of Antigen Diluent. Let fully dissolved the lyophilized content and then gently mix on vortex.
2. Gently mix the concentrated Enzyme Conjugate on vortex. Then add 0.1 ml of it to the vial of the dissolved T.gondii antigen and mix gently on vortex.

Important Notes:

1. Dissolve and prepare only the number of vials necessary to the test. The Immunocomplex obtained is not stable. Store any residual solution frozen in aliquots at -20°C .
2. The preparation of the Immucplex has to be done **right before** the dispensation of samples and controls into the plate. Mix again on vortex gently just before its use.

Specimen Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use

Chromogen/Substrate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes.

Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces.

If this component has to be transferred use only plastic, possible sterile disposable container

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.

H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.

P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution

of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.

2. The ELISA incubator has to be set at $+37^{\circ}\text{C}$ (tolerance of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The **ELISA washer** is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested). 5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing. An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm mandatory for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\text{ nm}$; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.
6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use the device if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check

that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.

- Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
- Dissolve the Calibrator as described above and gently mix.
- Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
- Set the ELISA incubator at +37°C and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
- Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
- If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
- Check that the micropipettes are set to the required volume.
- Check that all the other equipment is available and ready to use.
- In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

M.1 Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument aspirate 1000 µl Specimen Diluent and then 10 µl sample (1:101 dilution factor). The whole content is then dispensed into a properly defined dilution tube. Before the next sample is aspirated, needles have to be duly washed to avoid any cross-contamination among samples. When all the samples have been diluted make the instrument dispense 100 µl diluted samples into the proper wells of the microplate.

This procedure may be carried out also in two steps of dilutions of 1:10 each (90 µl Specimen Diluent + 10 µl sample) into a second dilution platform. Make then the instrument aspirate first 100 µl Specimen Diluent, then 10 µl liquid from the first dilution in the platform and finally dispense the whole content in the proper well of the assay microplate.

Do not dilute controls/calibrator as they are ready to use.

Dispense 100 µl calibrators/control in the appropriate calibration/control wells.

For the next operations follow the operative instructions reported below for the Manual Assay.

It is strongly recommended to check that the time lap between the dispensation of the first and the last sample will be calculated by the instrument and taken into consideration by delaying the first washing operation accordingly.

M. 2 Manual assay:

- Dilute samples 1:101 by dispensing first 10 µl sample and then 1 ml Specimen Diluent into a dilution tube; mix gently on vortex.
- Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the well in position A1 empty for the operation of blanking.
- Dispense 100 µl of Negative Control in triplicate and 100 µl of Calibrator in the proper wells in duplicate. Dispense 100 µl of Positive Control in single into the proper well. Do not dilute controls and the calibrator as they are ready to use !
- Dispense 100 µl diluted samples in the proper sample wells and then check that all the samples wells are blue colored and that controls and calibrator have been dispensed.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
- Pipette 100 µl Ag/Ab Immunocomplex into each well, except the blanking well A1, and cover with the sealer. Check that all wells are red colored, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Ag/Ab Immunocomplex. Contamination might occur.

- Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
- Wash microwells as in step 6.
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10. Addition of acid will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the color intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1 (mandatory).

Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has to be carried out just after the addition of the Stop Solution and anyway not any longer than 20 minutes after its addition. Some self oxidation of the chromogen can occur leading to high background.
- The Calibrator (CAL) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Calibrator may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Controls&calibrator	100 ul
Samples diluted 1:101	100 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Immunocomplex	100 ul
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H2O2 mix	100 ul
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme is reported below:

Microplate												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A quality control check is performed on the controls/calibrator any time the kit is used in order to verify whether the performance of the assay matches the requirements reported in table below.

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.050 OD450nm value
Negative Control mean value (NC)	< 0.150 OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Calibrator	S/Co > 1.5
Positive Control	> 0.750 OD450nm

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section.

If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problem	Check
Blank well > 0.050 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of negative control); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator S/Co < 1.5	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control < 0.750 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control). 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

P. CALCULATION OF THE CUT-OFF

The test results are calculated by means of the mean OD450nm value of the Negative Control (NC) and a mathematical calculation, in order to define the following cut-off formulation:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Important note: When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to calculate the cut-off value and generate the correct interpretation of results.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as a ratio of the sample OD450nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 1.0	Negative
1.0 - 1.2	Equivocal
> 1.2	Positive

A negative result indicates that the patient is not undergoing an acute infection of Toxoplasma gondii.

Any patient showing an equivocal result, should be re-tested by examining a second sample taken from the patient after 1-2 weeks from first testing.

A positive result is indicative of a Toxoplasma gondii infection.

An example of calculation is reported below:

Important Note: The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.050 – 0.060 – 0.070 OD450nm
Mean Value: 0.060 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted
Positive Control: 1.850 OD450nm
Higher than 0.750 – Accepted

$$\text{Cut-Off} = 0.060 + 0.250 = 0.310$$

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm
Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.7
S/Co higher than 1.0 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm
Sample 2: 1.690 OD450nm
Sample 1 S/Co < 1 = negative
Sample 2 S/Co > 1.2 = positive

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.
2. Particular attention in the interpretation of results has to be used in the follow-up of pregnancy for an infection of *Toxoplasma gondii* due to the risk of severe neonatal malformations.
3. Any positive sample should be submitted to the Confirmation Test reported in section T before giving a result of positivity. By carrying out this test, false reactions, leading to a misinterpretation of the analytical result, can be revealed and then ruled out.
4. In pregnancy monitoring, it is strongly recommended that any positive result is confirmed first with the procedure described below and secondly with a different device for *T.gondii* IgM detection, before taking any preventive medical action.
5. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of infection has to be taken and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

R. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Limit of detection

Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. has defined the 3rd WHO International Standard for TOXO IgG (Coded TOXG), positive also for IgM anti *Toxoplasma Gondii*, as an Internal Gold Standard (or IGS).

Results of Quality Control are given in the following table:

The limits of detection of this material, when diluted first in negative serum and then in the sample diluent to generate dilutions tested in four replicates, are reported in the following table for three lots of the device:

OD450nm values

WHO (IGS) IU/ml	TOXOM.CE Lot # 0703	TOXOM.CE Lot # 0603	TOXOM.CE Lot # 0503
3000 IU/ml	2.936	3.005	2.983
1500 IU/ml	2.547	2.615	2.589
750 IU/ml	2.350	2.433	2.378
375 IU/ml	1.368	1.452	1.377
188 IU/ml	0.911	1.125	0.968
94 IU/ml	0.522	0.637	0.561
47 IU/ml	0.271	0.338	0.285
23 IU/ml	0.176	0.171	0.115
Negative	0.060	0.055	0.052

In addition the preparation Accurun n° 136 supplied by Boston Biomedica Inc., USA, has been also used to detect the sensitivity of the device. The preparation was examined on three lots in 4 replicates. Results, expressed as S/Co values, are reported in table below:

ACCURUN # 136	TOXOM.CE Lot # 0703	TOXOM.CE Lot # 0603	TOXOM.CE Lot # 0503
1X	0.808	0.957	0.796
2X	0.389	0.468	0.369
4X	0.169	0.228	0.188
8X	0.065	0.078	0.059
Negative	0.051	0.063	0.044

2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity has been tested on panels of samples classified positive by a US FDA approved kit.

Positive samples were collected from patients carrying *T.gondii* acute infection, confirmed by clinical symptoms and analysis.

An overall value > 98% has been found in the study conducted on a total number of more than 60 samples.

The Performance Panel code PTT 201, supplied by Boston Biomedica Inc. USA, has been also evaluated. Data are reported below:

BBI Performance Panel code PTT 201

Sample ID	TOXOM.CE OD450nm	S/Co	REF BioMerieux VIDAS S/Co	Sample ID	TOXOM.CE OD450nm	S/Co	REF BioMerieux VIDAS S/Co
1	0.052	0.1	0.3	14	0.082	0.2	0.2
2	0.048	0.1	0.1	15	0.121	0.3	0.2
3	0.078	0.2	0.1	16	0.049	0.1	0.1
4	0.072	0.2	0.4	17	0.476	1.4	1.5
5	0.048	0.1	0.1	18	0.057	0.1	0.1
6	0.044	0.1	0.1	19	0.185	0.5	0.2
7	0.045	0.1	0.1	20	0.092	0.2	0.4
8	1.134	3.5	3.5	21	0.165	0.5	0.1
9	0.126	0.3	0.1	22	0.084	0.2	0.1
10	0.047	0.1	0.1	23	3.181	9.8	10.3
11	1.232	3.8	2.4	24	0.137	0.4	0.2
12	0.088	0.2	0.1	25	1.007	3.1	1.8
13	3.166	9.8	7.3				

3. Diagnostic Specificity:

The diagnostic specificity has been determined on panels of more than 300 specimens, negative with the reference kit, derived from normal individuals of European origin.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether this interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

A study conducted on more than 60 potentially cross-reactive samples has not revealed any interference in the system. No cross reaction were observed.

The Performance Evaluation study conducted in a qualified external reference center on more than 400 total samples has provided a value > 98%.

False positive reactions may be anyway pointed out and then ruled out in the interpretation of results with the procedure reported in section T, able to verify whether or not a positive result is real.

4. Precision:

It has been calculated on three samples, a negative, a low positive and a positive, examined in 16 replicates in three separate runs. Results are reported as follows:

TOXOM.CE: lot # 0703

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.058	0.072	0.076	0.069
Std.Deviation	0.005	0.006	0.007	0.006
CV %	8.9	8.3	9.1	8.7

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.583	0.567	0.579	0.576
Std.Deviation	0.040	0.049	0.056	0.048
CV %	6.8	8.6	9.7	8.4

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.754	2.625	2.625	2.668
Std.Deviation	0.247	0.214	0.126	0.196
CV %	9.0	8.2	4.8	7.3

TOXOM.CE: lot # 0603

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.063	0.064	0.061	0.063
Std.Deviation	0.008	0.012	0.009	0.010
CV %	13.2	18.2	15.3	15.6

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.641	0.651	0.644	0.645
Std.Deviation	0.038	0.042	0.042	0.041
CV %	5.9	6.5	6.6	6.3

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.889	2.830	2.879	2.866
Std.Deviation	0.122	0.123	0.074	0.106
CV %	4.2	4.4	2.6	3.7

TOXOM.CE: lot # 0403

Negative (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.057	0.060	0.060	0.059
Std.Deviation	0.006	0.007	0.006	0.007
CV %	11.1	12.4	10.5	11.3

Low reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.544	0.556	0.520	0.540
Std.Deviation	0.040	0.078	0.058	0.058
CV %	7.3	14.0	11.1	10.8

High reactive (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.850	2.866	2.846	2.854
Std.Deviation	0.139	0.122	0.126	0.129
CV %	4.9	4.3	4.4	4.5

S. LIMITATIONS

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

T. CONFIRMATION TEST

In order to provide the medical doctor with the best accuracy in the follow-up of pregnancy, where a false positive result could lead to an operation of abortion, a confirmation test is reported. The confirmation test has to be carried out on any positive sample before a diagnosis of primary infection of Toxoplasma gondii is released to the doctor.

Proceed for confirmation as follows:

1. Prepare the Antigen/Conjugate Complex as described in the proper section. This reagent is called Solution A.
2. Then 25 µl concentrated Enzymatic Conjugate are diluted in 500 µl Antigen Diluent and mixed gently on vortex. Do not use any lyophilized vial of T.gondii for this procedure ! This solution is called Solution B.
3. The well A1 of the strip is left empty for blanking.
4. The Negative Control is dispensed in the strip in positions B1+C1. This is used for the calculation of the cut-off and S/Co values.
5. The positive sample to be confirmed, diluted 1:101, is dispensed in the strip in position D1+E1.
6. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
7. After washing, the blank well A1 is left empty.
8. 100 µl of Solution A are dispensed in wells B1+C1+D1.
9. Then 100 µl of Solution B are added to well E1.
10. The strip is incubated for 60 min at +37°C.
11. After washing, 100 µl Chromogen/Substrate are added to all the wells and the strip is incubated for 20 min at r.t.
12. 100 µl Sulphuric Acid are added to all the wells and then their color intensity is measured at 450nm (reading filter) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

Interpretation of results is carried out as follows:

1. If the sample in position D1 shows a S/Co value lower than 1.0 a problem of dispensation or contamination in the first test is likely to be occurred. The Assay Procedure in Section M has to be repeated to double check the analysis.
2. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.2 and in position E1 shows a S/Co value still higher than 1.2 the sample is considered a **false positive**. The reactivity of the sample is in fact not dependent on the specific presence of T.gondii and a crossreaction with the monoclonal antibody, labeled with HRP, has occurred.
3. If the sample in position D1 shows a S/Co value higher than 1.2 and in position E1 shows a S/Co value lower than 1.2 the sample is considered a **true positive**. The reactivity of the sample is in fact dependent on the specific presence of T.gondii and not due to any crossreaction.

The following table is reported for the interpretation of results:

Well	S/Co		
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.2
Interpretation	Problem of contam.	False positive	True positive

REFERENCES

1. Engvall E. et al.. J.Immunochemistry, 8: 871-874, 1971.
2. Engvall E. et al.. J.Immunol., 109: 129-135, 1971
3. Remington J.S. et al.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". 1966. Sanders, Philadelphia, London Toronto.
4. Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd edition, pp 729, 1982. G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, San Josè, Toronto.

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy

CE
0318

Toxo IgM

**Ensayo inmunoenzimático (ELISA) de
“captura” para la determinación de
anticuerpos IgM frente a
Toxoplasma gondii
en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro” -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

Toxo IgM

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM frente a *Toxoplasma gondii* en plasma y suero humanos, mediante un sistema de "captura".

El equipo ha sido concebido para el seguimiento de pacientes infectados por *T. gondii* y de la infección durante el embarazo, causa de riesgo de malformaciones en el neonato.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

Toxoplasma gondii es un protozoo, parásito intracelular obligado, que puede infectar probablemente a todas las especies de mamíferos, incluido el hombre.

La detección de anticuerpos IgM frente a *T. gondii* es particularmente útil en el diagnóstico de la infección aguda, ya sea en los individuos "de riesgo", durante el embarazo, en personas sometidas a trasplante de órganos, o en pacientes con SIDA.

Gran parte de las infecciones por *T. gondii* en individuos sanos son leves o asintomáticas. La detección de anticuerpos IgM al mismo, en ausencia de anticuerpos detectables de clase IgG, es de gran importancia en el seguimiento de infecciones agudas durante el embarazo ya que el parásito puede ocasionar severos trastornos en el neonato. Por otra parte, como las infecciones agudas por *T. gondii* son graves en pacientes inmunocomprometidos, deben ser diferenciadas de otros tipos de trastornos.

El sistema ELISA de captura de IgM constituye una prueba diagnóstica potente y segura, sobretodo porque no se ve afectada en presencia del factor reumatoide como ha sucedido en los ensayos clásicos tipo "sandwich".

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El ensayo se basa en el principio de "captura de IgM", donde los anticuerpos de esta clase presentes en la muestra son capturados por la fase sólida recubierta con un anticuerpo anti-IgM humana.

Después del lavado, que elimina el resto de los componentes de la muestra en particular los anticuerpos IgG, se adiciona una preparación inactivada de *T. gondii*, marcado con un anticuerpo monoclonal conjugado con Peroxidasa (HRP), lo cual permite detectar los anticuerpos IgM inmovilizados en la fase sólida.

Posteriormente a la incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier traza de conjugado en exceso y se añade el sustrato cromogénico. En presencia del conjugado el sustrato es hidrolizado generándose una señal de color proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM a *Toxoplasma gondii* presentes en la muestra.

La Prueba de Confirmación controla la presencia de falsos positivos, lo cual permite a los clínicos una correcta interpretación de los resultados.

D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales de cabra anti-IgM humana, purificados por afinidad, en presencia de proteínas de bovino.

Las placas están en una bolsa sellada con desecante. Se deben poner las mismas a temperatura ambiente antes de

abrir las, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar entre 2 y 8°C.

2. Control Negativo: CONTROL -

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de plasma humano negativo a IgM-*T. gondii*, 2% de caseína, tampón Tris-citrato 10 mM pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, además de azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

El control negativo es incoloro.

3. Control Positivo: CONTROL +

1x4.0 ml/vial. Listo para el uso. Contiene 1% de plasma humano positivo a IgM-*T. gondii*, 2% de caseína, tampón Tris-citrato 10 mM pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, y también azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

El control positivo está codificado con el color verde.

4. Calibrador: CAL ...ml

n° 1 vial. Liofilizado. Para disolver en agua calidad EIA como se indica en la etiqueta. Contiene IgM anti *T. gondii* a 200 O.M.S. IU/ml +/-10% (3^{er} Estándar Internacional de la O.M.S. para *T. gondii* IgG&IgM), contiene además suero fetal bovino, sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Nota: El volumen necesario para disolver el contenido del frasco varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen indicado en la etiqueta.

5. Antígenos liofilizados de *T.gondii* : AG TOXO

N° 6 viales liofilizados. Contienen *T. gondii* liofilizado, inactivado por radiaciones gamma, diluido en un tampón proteico. Contienen además 2% de proteínas de bovino, tampón Tris HCl 10 mM pH 6.8+/-0.1, sulfato de gentamicina 0.2 mg/ml y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Debe disolverse con 1.9 ml de Diluyente de Antígeno, según se indica más adelante.

6. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 +/- 0.2, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%

7. Conjugado: CONJ 20X

1x0.8 ml/vial. Solución concentrada 20x de un anticuerpo monoclonal anti-*T. gondii*, conjugado con peroxidasa (HPR) diluido en un tampón proteico. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, y también 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservantes.

8. Diluyente de Antígeno: AG DIL

n° 1 vial de 16 ml. Solución tamponada proteica para la preparación del Inmunocomplejo. Contiene tampón Tris 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 2% de BSA, además 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservantes. El reactivo está codificado con el color rojo (0.01% de colorante rojo).

9. Diluyente de muestras DILSPE

2x60ml. Solución tamponada proteica para la dilución de las muestras. Contiene 2% de caseína, tampón Citrato 10mM a pH 6.8 +/- 0.1, 0.1% de Tween 20, además azida sódica al 0.09% y 0.045% de ProClin 300 como conservantes.

El reactivo está codificado con el color azul (0.01% de colorante azul).

10. Cromógeno/Substrato SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50mM pH 3.5-3.8, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02% así como dimetilsulfóxido 4%.

Nota: Evitar la exposición a la luz, la sustancia es fotosensible.

11. Ácido Sulfúrico: H_2SO_4 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H_2SO_4 0.3M

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

12. Sellador adhesivo, n° 2

13. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (1000µl, 100µl y 10µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. Timer con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C (+/-0.5°C tolerancia).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar los indumentales protectores adecuados de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
7. Comprobar que los reactivos no contengan precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente y reemplazar el equipo.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de vencimiento indicada en el equipo e internamente en los reactivos. Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infectivas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud:

"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.

12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infectivos y deben ser inactivados. Se recomienda la inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.
14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados. Se recomienda el uso del código de barras.
3. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
4. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para períodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante varios meses, evitando luego descongelar cada muestra más de una vez, ya que se pueden generar partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
5. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Estudios de estabilidad realizados en equipos en uso no han arrojado pérdida de actividad significativa en un período de hasta 3 meses.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el

desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Control Negativo:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar.

Control Positivo:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar.

Calibrador:

Añadir al polvo liofilizado, el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver completamente y después mezclar cuidadosamente con el vórtex antes de usar.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada y mezclarse delicadamente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Inmunocomplejo Antígeno/Anticuerpo :

Proceder cuidadosamente según se indica:

1. Disolver el contenido de un vial liofilizado utilizando 1.9 ml de Diluyente de Antígeno. Dejar disolver completamente y después mezclar cuidadosamente con el vórtex.
2. Mezclar el Conjugado concentrado con ayuda del vórtex. Añadir después 0.1 ml del mismo al vial del Ag de *T. gondii* disuelto y mezclar suavemente en el vórtex.

Notas Importantes:

1. Disolver y preparar solamente los viales necesarios para la prueba. El inmunocomplejo obtenido no es estable. Almacenar la solución sobrante en alícuotas a -20°C.
2. La preparación del inmunocomplejo debe realizarse **justo antes** de dispensar las muestras y los controles en la placa. Mezclar nuevamente en vórtex justo antes de usar.

Diluyente de muestras :

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben estar calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra o los reactivos (alcohol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%. Deben descontaminarse periódicamente los residuos de los componentes del equipo.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C de tolerancia) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El **lavador ELISA** es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10nm b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0, c) Linealidad ≥ 2.0, reproducibilidad ≥ 1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medida de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por

muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquiasaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.

7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no sean contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.
3. Disolver el Calibrador como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
4. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
5. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar luego suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
6. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y alimentar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
10. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
11. En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

M.1 Ensayo automatizado:

En caso de que el ensayo se realice de manera automatizada con un sistema ELISA, se recomienda programar el equipo para aspirar 1000µl de Diluyente de Muestras, y posteriormente 10µl de muestra (factor de dilución 1:101).

La mezcla debe ser dispensada cuidadosamente en un tubo de dilución. Antes de aspirar la muestra siguiente, las agujas deben lavarse debidamente para evitar cualquier contaminación cruzada entre las muestras. Cuando todas las muestras han sido diluidas, programar el equipo para dispensar 100 µl de las mismas en los pocillos correspondientes.

Este procedimiento puede realizarse en dos pasos de dilución de 1:10 cada uno (90 µl de Diluyente de Muestras + 10 µl de muestra) en una segunda plataforma de dilución. Programar el equipo para aspirar primeramente 100 µl de Diluyente de Muestras, después 10 µl de la primera dilución en la plataforma y finalmente dispensar todo el contenido en los pocillos apropiados de la microplaca.

No diluir el Calibrador ni los controles, ya que están listos para el uso.

Dispensar 100µl de controles/calibrador en los pocillos correspondientes.

Para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen debajo para el Ensayo Manual.

Es muy importante comprobar que el tiempo entre el dispensado de la primera y la última muestra sea calculado por el instrumento y considerado para los lavados.

M. 2 Ensayo Manual.

1. Diluir las muestras 1:101 dispensando primeramente 10 µl de muestra y después 1 ml de Diluyente de Muestras en un tubo de dilución, mezclar bien con vórtex.
2. Poner el número de tiras necesarias en el soporte plástico. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
3. Dispensar 100 µl del Control Negativo por triplicado y 100µl de Calibrador por duplicado, después dispensar 100µl del Control Positivo, sencillo, en los respectivos pocillos. No diluir los controles ni el calibrador ya que están listos para el uso!
4. Dispensar 100 µl de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes y chequear después que estos pocillos son de color azul y que los controles y el calibrador han sido añadidos.
5. Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace el ensayo manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

6. Lavar la microplaca con el lavador automático según se indica (sección I.3).
7. Dispensar 100µl del **Inmunocomplejo Antígeno/Anticuerpo** en todos los pocillos, excepto en el A1 y cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo haya sido añadido en todos los pocillos excepto el A1.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el **Inmunocomplejo Antígeno/Anticuerpo**. Podría producirse contaminación.

8. Incubar la microplaca **60 min a +37°C**.
9. Lavar la microplaca, de igual forma que en el paso 6.
10. Dispensar 100µl del Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1. Incubar la microplaca a **temperatura ambiente (18-24°C) por 20 minutos**.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

11. Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 10. La adición del ácido cambia el color de los controles positivos y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco, obligatorio).

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de stop y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo

3. El calibrador (CAL) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El calibrador (CAL) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Controles&Calibrador	100 µl
Muestras diluidas 1:101	100 µl
1^{ra} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Inmunocomplejo	100 µl
2^{da} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
Mezcla TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3^{ra} incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Ácido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm / 620-630nm

t.a.*temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado:

Microplaca												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 2										
B	CN	M 3										
C	CN	M 4										
D	CN	M 5										
E	CAL	M 6										
F	CAL	M 7										
G	CP	M 8										
H	M 1	M9										

Leyenda: BL = Blanco CN = Control Negativo
CAL = Calibrador CP = Control Positivo M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un control de validación sobre los controles y el calibrador cada vez que se usa el equipo, para verificar si el performance del ensayo es el esperado.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.050 DO450nm
Control Negativo, valor medio (CN)	< 0.150 DO450nm valor después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Calibrador	M/Co > 1.5
Control Positivo	> 0.750 DO450nm

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.050DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Control Negativo (CN) > 0.150 DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido alimentado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del control negativo o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.
Calibrador M/Co < 1.5	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el control negativo en lugar del calibrador). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Control Positivo < 0.750 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no se han cometido errores en el procedimiento (dispensar el control negativo en lugar del positivo). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del control positivo.

Si ocurre alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, informe al responsable para tomar las medidas pertinentes.

P. CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE.

Los resultados de la prueba se calculan a partir de un valor medio de DO450nm del control Negativo (CN), mediante un valor de corte (Co) hallado con la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de corte} = \text{CN} + 0.250$$

El valor encontrado en la prueba es utilizado para la interpretación de los resultados, según se describe a continuación.

Nota Importante: Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La interpretación de los resultados se realiza mediante la relación entre las DO a 450nm de las muestras (M) y el Valor de corte (Co).

Los resultados se interpretan según la siguiente tabla:

(M/Co)	Interpretación
< 1.0	Negativo
1.0 – 1.2	Equívoco
> 1.2	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está padeciendo infección aguda por *T. gondii*.
Cualquier paciente, cuya muestra resulte equívoca debe someterse a una nueva prueba con una segunda muestra de sangre colectada 1 ó 2 semanas después de la inicial.
Un resultado positivo es indicativo de infección por *T. gondii*.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar:

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Control Negativo: 0.050 – 0.060 – 0.070 DO 450nm

Valor medio: 0.060 DO 450nm

Menor de 0.150 – Válido

Control Positivo: 1.850 DO 450nm

Mayor de 0.750 – Válido

Valor de corte = 0.060+0.250 = 0.310

Calibrador: 0.550 - 0.530 DO 450nm

Valor medio: 0.540 DO 450nm M/Co = 1.7

M/Co Mayor de 1.0 – Válido

Muestra 1: 0.070 DO 450nm

Muestra 2: 1.690 DO 450nm

Muestra 1 M/Co < 1 = negativa

Muestra 2 M/Co > 1.2 = positiva

Notas importantes:

- La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
- Debe ponerse particular atención a la interpretación de los resultados ante sospecha de infección primaria por *T. gondii* en el embarazo, debido al riesgo de malformaciones en el neonato.
- Antes de emitir un criterio de positividad, cada muestra positiva debe ser sometida a la Prueba Confirmatoria reportada en la sección T. Mediante la misma es posible descartar cualquier error en la interpretación del resultado analítico producido por una falsa reactividad de la muestra.
- En el monitoreo de infección por *T. gondii* durante el embarazo, se recomienda, antes de tomar cualquier decisión médica preventiva, confirmar cualquier resultado positivo, primero con el procedimiento descrito y después con un sistema de detección de IgM.
- Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
- El diagnóstico de infección debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. CARACTERÍSTICAS DEL PERFORMANCE.

1. Límite de detección.

Dia.Pro Diagnostic BioProbes s.r.l. ha definido como Gold Standard Interno (IGS) el 3^{er} Estándar Internacional O.M.S. para TOXO IgG (Código TOXG), positivo además para IgM anti *Toxoplasma Gondii*.

En la siguiente tabla se muestran los resultados, para tres lotes del producto, después de una primera dilución en suero negativo y posteriormente en Diluyente de Muestras con el objetivo de generar un sistema de diluciones a probar en cuatro réplicas.

Valores DO450nm

O.M.S (IGS) IU/ml	TOXOM.CE Lote # 0703	TOXOM.CE Lote # 0603	TOXOM.CE Lote # 0503
3000 IU/ml	2.936	3.005	2.983
1500 IU/ml	2.547	2.615	2.589
750 IU/ml	2.350	2.433	2.378
375 IU/ml	1.368	1.452	1.377
188 IU/ml	0.911	1.125	0.968
94 IU/ml	0.522	0.637	0.561
47 IU/ml	0.271	0.338	0.285
23 IU/ml	0.176	0.171	0.115
Negativo	0.060	0.055	0.052

Para detectar la sensibilidad del equipo se probó además la preparación Accurun n° 136 suministrada por Boston Biomedical Inc., Estados Unidos. La preparación ha sido examinada en tres lotes en cuatro réplicas. En la siguiente tabla se relacionan los resultados expresados como valores de M/Co:

ACCURUN # 136	TOXOM.CE Lote # 0703	TOXOM.CE Lote # 0603	TOXOM.CE Lote # 0503
1X	0.808	0.957	0.796
2X	0.389	0.468	0.369
4X	0.169	0.228	0.188
8X	0.065	0.078	0.059
Negativo	0.051	0.063	0.044

2. Sensibilidad Diagnóstica

La sensibilidad diagnóstica se ha estudiado utilizando paneles de muestras, clasificadas como positivas mediante un equipo de referencia US FDA.

Las muestras positivas se obtuvieron de pacientes con infección aguda por *T. gondii*, confirmada mediante análisis clínicos y la observación de los síntomas.

El valor del análisis obtenido después del estudio de más de 60 muestras, fue > 98%.

Se evaluaron además el Performance Panel PTT 201, suministrado por BBI, Estados Unidos.

Los valores se muestran a continuación.

BBI Performance Panel PTT 201

Muestra ID	TOXOM.CE DO450nm	M/Co	REF BioMerieux VIDAS M/Co	Muestra ID	TOXOM.CE DO450nm	M/Co	REF BioMerieux VIDAS M/Co
1	0.052	0.1	0.3	14	0.082	0.2	0.2
2	0.048	0.1	0.1	15	0.121	0.3	0.2
3	0.078	0.2	0.1	16	0.049	0.1	0.1
4	0.072	0.2	0.4	17	0.476	1.4	1.5
5	0.048	0.1	0.1	18	0.057	0.1	0.1
6	0.044	0.1	0.1	19	0.185	0.5	0.2
7	0.045	0.1	0.1	20	0.092	0.2	0.4
8	1.134	3.5	3.5	21	0.165	0.5	0.1
9	0.126	0.3	0.1	22	0.084	0.2	0.1
10	0.047	0.1	0.1	23	3.181	9.8	10.3
11	1.232	3.8	2.4	24	0.137	0.4	0.2
12	0.088	0.2	0.1	25	1.007	3.1	1.8
13	3.166	9.8	7.3				

3. Especificidad Diagnóstica:

La especificidad diagnóstica ha sido determinada utilizando paneles de más de 300 muestras provenientes de individuos sanos de origen europeo, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humano para determinar la especificidad. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas han sido probadas para comprobar si la colección y la conservación interfiere con el procedimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

Un estudio realizado con más de 60 muestras que pudieran presentar potencialmente reactividad cruzada, no reveló interferencia alguna en el sistema. No se detectó reacción cruzada.

El estudio para evaluar el performance, realizado en un centro de referencia externo con más de 400 muestras totales, reveló un valor > 98%.

El procedimiento reportado en la sección T permite detectar y descartar los falsos positivos en la interpretación de los resultados y por tanto verificar si un resultado positivo es real.

La Prueba de Confirmación es un sistema que permite estimar, con un 100% de confiabilidad, la especificidad de una prueba (ya que en ausencia de un antígeno específico, un resultado positivo no es posible).

4. Precisión:

Ha sido calculada a partir de tres muestras, una negativa, una debilmente positiva y una positiva, examinadas en 16 réplicas en tres series separadas.

Los resultados son los siguientes:

TOXOM.CE: lote # 0703

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.058	0.072	0.076	0.069
Desviación estándar	0.005	0.006	0.007	0.006
CV %	8.9	8.3	9.1	8.7

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.583	0.567	0.579	0.576
Desviación estándar	0.040	0.049	0.056	0.048
CV %	6.8	8.6	9.7	8.4

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.754	2.625	2.625	2.668
Desviación estándar	0.247	0.214	0.126	0.196
CV %	9.0	8.2	4.8	7.3

TOXOM.CE: lote # 0603

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.063	0.064	0.061	0.063
Desviación estándar	0.008	0.012	0.009	0.010
CV %	13.2	18.2	15.3	15.6

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.641	0.651	0.644	0.645
Desviación estándar	0.038	0.042	0.042	0.041
CV %	5.9	6.5	6.6	6.3

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.889	2.830	2.879	2.866
Desviación estándar	0.122	0.123	0.074	0.106
CV %	4.2	4.4	2.6	3.7

TOXOM.CE: lote # 0403

Negativa (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.057	0.060	0.060	0.059
Desviación estándar	0.006	0.007	0.006	0.007
CV %	11.1	12.4	10.5	11.3

Débil reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	0.544	0.556	0.520	0.540
Desviación estándar	0.040	0.078	0.058	0.058
CV %	7.3	14.0	11.1	10.8

Altamente reactiva (N = 16)

Valores medios	1ª serie	2ª serie	3ª serie	Valor promedio
DO 450nm	2.850	2.866	2.846	2.854
Desviación estándar	0.139	0.122	0.126	0.129
CV %	4.9	4.3	4.4	4.5

S. LIMITACIONES.

La contaminación bacterica o la inactivación por calor de la muestra pueden afectar los valores de DO y por tanto alterar los niveles del analito.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

El ensayo es útil solo para probar muestras independientes y no mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse en base a un solo resultado, sino que deben tenerse en consideración la historia clínica del paciente, la sintomatología, así como otros datos diagnósticos.

T. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN.

Se realiza esta prueba con el propósito de garantizar la mayor precisión del ensayo en el seguimiento del embarazo, donde un resultado falso positivo puede conducir a un aborto. La misma debe realizarse a cada una de las muestras positivas, antes de emitir un diagnóstico de infección por *Toxoplasma gondii*.

Proceder para la confirmación como sigue:

1. Preparar el Inmunocomplejo Antígeno/Anticuerpo según se describe en la sección. Este reactivo se denomina Solución A.
2. Diluir 25 µl del Conjugado concentrado en 500 µl de Diluyente de Antígeno, mezclar delicadamente con ayuda del vórtex. No usar para este procedimiento ningún vial liofilizado de *T. gondii*. Este reactivo se denomina Solución B.
3. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.

4. Dispensar el Control Negativo en las posiciones B1+C1, el mismo se usa para calcular el valor de corte y los valores M/Co.
5. La muestra positiva a confirmar, diluida 1:101, se añade en las posiciones D1+E1.
6. Incubar la tira durante 60 min a +37°C.
7. después del lavado el pocillo A1 queda vacío.
8. Dispensar 100 µl de la Solución A en los pocillos B1+C1+D1.
9. Dispensar 100 µl de la Solución B en el pocillo E1.
10. Incubar la tira durante 60 min a +37°C.
11. Después del lavado, adicionar a todos los pocillos 100 µl del Cromógeno/Substrato, posteriormente incubar la tira durante 20 minutos a t.a.
12. Dispensar 100 µl de Ácido sulfúrico en todos los pocillos, medir después la intensidad del color utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (Milán) – Italia



0318

La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente forma:

1. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co menor de 1.0, probablemente en el primer ensayo haya ocurrido un error en el dispensado o alguna contaminación. Debe repetirse el Procedimiento del Ensayo, sección M.
2. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co mayor de 1.2 y en posición E1 el valor de M/Co es todavía mayor de 1.2, la muestra se considera un **falso positivo**. La reactividad de la muestra, en este caso, no depende de la presencia específica de *T.gondii*, por lo tanto ha ocurrido una reacción cruzada con el anticuerpo monoclonal conjugado con HRP.
3. Si la muestra en posición D1 tiene un valor de M/Co mayor de 1.2 y en la posición E1 el valor M/Co es menor de 1.2 se considera **realmente positiva**. La reactividad de la muestra, en este caso se debe a la presencia específica del protozoo y no a reacciones cruzadas.

En la siguiente tabla se muestra la interpretación de los resultados:

Pocillo	M/Co		
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.2
Interpretación	Probl. de contam.	Falso positivo	Realmente positivo

BIBLIOGRAFÍA.

1. Engvall E. et al.. J.Immunochimistry, 8: 871-874, 1971.
2. Engvall E. et al.. J.Immunol., 109: 129-135, 1971
3. Remington J.S. et al.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". 1966. Sanders, Philadelphia, London Toronto.
4. Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd edition, pp 729, 1982. G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, San José, Toronto.

