

TOXO IgG

**Enzyme Immunoassay for the
quantitative/qualitative determination of
IgG antibodies to Toxoplasma gondii
in human serum and plasma**

- 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

Code: TOXOG.CE
96 Tests

TOXO IgG

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* in plasma and sera.

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

Microplates are coated with native *T. gondii* antigens, highly purified by sucrose gradient centrifugation and inactivated.

The solid phase is first treated with the diluted sample and IgG to *T. gondii* are captured, if present, by the antigens.

After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound anti *Toxoplasma gondii* IgG are detected by the addition of polyclonal specific anti human IgG antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate/chromogen mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti *Toxoplasma gondii* IgG antibodies present in the sample. A Calibration Curve, calibrated against the W.H.O 3rd international standard, makes possible a quantitative determination of the IgG antibody in the patient.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. : Microplate: MICROPLATE

12 strips x 8 microwells coated with purified and gamma-irradiation inactivated *Toxoplasma gondii* 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. Calibration Curve: CAL N°

Ready to use and colour coded, calibrated against the 3rd international standard produced by the World Health Organization (WHO). The calibration curve range is as follows:

4ml CAL 1 = 0 WHO IU/ml

4ml CAL 2 = 50 WHO IU/ml

2ml CAL 3 = 100 WHO IU/ml

2ml CAL 4 = 250 WHO IU/ml

2ml CAL 5 = 500 WHO IU/ml

4ml CAL 6 = 1000 WHO IU/ml.

It contains Toxo IgG positive plasma titrated against WHO 3rd international standard code TOXM, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 2% casein, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and

0.045% ProClin 300 as preservatives. Standards are blue colored.

3. Control Serum: CONTROL

n° 1 vial - Lyophilized. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains fetal bovine serum, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives and human plasma positive to *T.gondii* calibrated at 250 IU/ml +/-10%, whose content is calibrated on 3rd international standard produced by the World Health Organization (WHO - TOXM).

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 .

4. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle20x 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.

5. Enzyme conjugate : CONJ

2x8ml/vial. Ready to use and red colour coded. It contains Horseradish peroxidase conjugated polyclonal antibodies to human IgG, 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.2 mg/ml gentamicine sulphate as preservatives. Coded with 0.01% red alimentary dye

6. Chromogen/Substrate: SUBS TMB

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

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

7. Sulphuric Acid: H2SO4 0.3 M

1x15ml/vialIt contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

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

8. Specimen Diluent: DILSPE

2x60ml/vial. It contains 2% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. To be used to dilute the sample.

9. Plate sealing foils n° 2

10. 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-borne 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 at least 12 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.

6. Samples whose anti-T.gondii IgG antibody concentration is expected to be higher than 1000 IU/ml should be diluted before use, either 1:10 or 1:100 in the Calibrator 0 IU/ml. Dilutions have to be done in clean disposable tubes by diluting 50 ul of each specimen with 450 ul of Cal 0 (1:10). Then 50 ul of the 1:10 dilution are diluted with 450 ul of the Cal 0 (1:100). Mix tubes thoroughly on vortex and then proceed toward the dilution step reported in section M.

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.

Calibration Curve

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

Control Serum

Add the volume of ELISA grade water, reported on the label, to the lyophilised powder; let fully dissolve and then gently mix on vortex.

Note: The control after dissolution is not stable. Store 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° C.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

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

If this component has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

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

Sample Diluent

Ready to use component. Mix carefully on vortex before use.

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 +/-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°C (tolerance of +/-0.5°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 ±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 ≤ 10 nm; (b)

absorbance range from 0 to ≥ 2.0; (c) linearity to ≥ 2.0; repeatability ≥ 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 if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates.
3. Check that the Chromogen (TMB) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette.
4. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
5. Dissolve the content of the lyophilised Control Serum as reported in the proper section.
6. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
7. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
8. 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.
9. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
10. If using an automated work station, turn on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
11. Check that the micropipettes are set to the required volume.
12. Check that all the other equipment is available and ready to use.
13. 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.

The kit may be used for quantitative and qualitative determinations as well.

M.1 Quantitative analysis

Automated assay:

In case the test is carried out automatically with an ELISA system, we suggest to make the instrument aspirate 1000 µl Sample 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 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 Sample Diluent + 10 µl sample) into a second dilution platform. Make then the instrument aspirate first 100 µl Sample 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.

Manual assay:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st and 2nd wells (positions A1 and B1 of the microplate) empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrators and 100 µl Control Serum in duplicate. Then dispense 100 µl of 1:101 diluted samples in each properly identified well.
4. 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.

5. Wash the microplate with an automatic washer as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the 1st and the 2nd blanking wells, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1 and B1.

Important notes:

1. Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.
2. Mix thoroughly the Enzyme Conjugate on vortex before its use !!!
7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. Pipette 100 µl Chromogen/Substrate mixture into each well, the blank wells A1 and B1 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.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.

11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M.2 QUALITATIVE ANALYSIS

If only a qualitative determination is required, proceed as described below:

Automated assay:

Proceed as described in section M1.

Manual assay:

1. Dilute samples 1:101 into a properly defined dilution tube (example: 1000 µl Sample Diluent + 10 µl sample). Do not dilute the Calibration Set as calibrators are ready to use. Mix carefully all the liquid components on vortex and then proceed as described below.
2. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well (positions A1 of the microplate) empty for the operation of blanking.
3. Dispense 100 µl of Calibrator 0 IU/ml and 100 µl of Calibrator 50 IU/ml in duplicate, and 100 µl of Calibrator 1000 IU/ml in single. Then dispense 100 µl of 1:101 diluted samples in each properly identified well.
4. 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.

5. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µl/well of diluted washing solution as reported previously (section I.3).
6. Pipette 100 µl Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important notes:

1. Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.
2. Mix thoroughly the Enzyme Conjugate on vortex before its use !!!
7. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
8. Wash microwells as in step 5.
9. 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.

10. Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9. Addition of acid will turn the positive calibrators, the control serum and the positive samples from blue to yellow.
11. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and at 620-630nm (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1.

General Important notes:

1. Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. 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.
3. The Control Serum (CS) does not affect the test results calculation. The Control Serum may be used only when a laboratory internal quality control a laboratory internal quality control is required by the management.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations
Calibrators & Control	100 µl
Samples diluted 1:101	100 µl
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme conjugate	100 µl
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Wash step	n° 5 with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3rd incubation	20 min
Temperature	r.t.
Sulphuric Acid	100 µl
Reading OD	450nm / 620-630nm

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S 1									
B	BLK	CAL4	S 2									
C	CAL1	CAL5	S 3									
D	CAL1	CAL5	S 4									
E	CAL2	CAL6	S 5									
F	CAL2	CAL6	S 6									
G	CAL3	CS	S 7									
H	CAL3	CS	S 8									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrator CS = Control Serum S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

Microplate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL2	S 6	S 14									
E	CAL2	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S 1	S 9	S 17									
H	S 2	S 10	S 18									

Legenda: BLK = Blank CAL = Calibrators CS = Control Serum S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as expected and required by the IVDD directive 98/79/EC. Control that the following data are matched:

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm value
Calibrator 0 IU/ml (CAL1)	< 0.150 mean OD450nm value after blanking coefficient of variation < 30%
Calibrator 50 IU/ml	OD450nm > OD450nm CAL1 + 0.100
Calibrator 1000 IU/ml	OD450nm > 1.000
Control Serum	250 WHO IU/ml +/-10%

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 operate as follows:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not got contaminated during the assay
Calibrator 0 IU/ml > 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 a positive calibrator instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative calibrator or of their wells has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes haven't got contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.

Calibrator 50 IU/ml OD450nm < OD450nm CAL1 + 0.100	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (ex.: dispensation of a wrong calibrator 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.
Calibrator 1000 IU/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly executed; 2. that no mistake has been done in its distribution (dispensation of a wrong calibrator 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 positive control has occurred.
Control Serum Different from expected value	First verify that: 1. the procedure has been correctly performed; 2. no mistake has occurred during its distribution (e.g.: dispensation of a wrong sample); 3. the washing procedure and the washer settings are correct; 4. no external contamination of the standard has occurred. 5. the Control Serum has been dissolved with the right volume reported on the label. If a mistake has been pointed out, the assay has to be repeated after eliminating the reason of this error. If no mistake has been found, proceed as follows: a) a value up to +/-20% is obtained: the overall Precision of the laboratory might not enable the test to match the expected value +/-10%. Report the problem to the Supervisor for acceptance or refusal of this result. b) a value higher than +/-20% is obtained: in this case the test is invalid and the DiaPro's customer service has to be called.

Should one of these problems have happened, after checking, report to the supervisor for further actions.

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

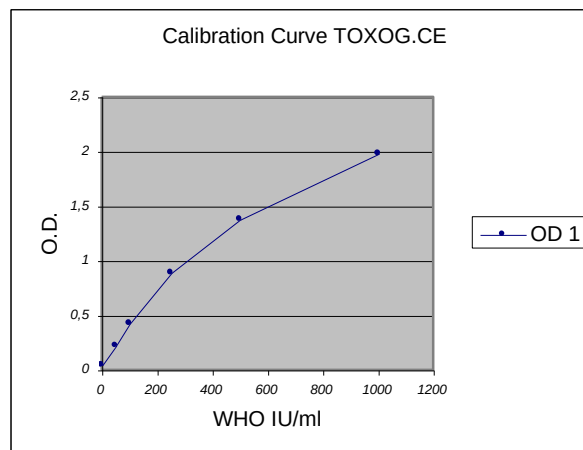
P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm (4-parameters interpolation is suggested).

Then on the calibration curve calculate the concentration of anti Toxoplasma gondii IgG antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported in this page.



Important Notes:

Do not use the calibration curve above to make calculations.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm values for the Calibrators 0 and 50 IU/ml and then check that the assay is valid.

An example of calculation is reported below (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 11).

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

Calibrator 0 IU/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
Mean Value: 0.022 OD450nm
Lower than 0.150 – Accepted
Calibrator 50 IU/ml: 0.250 – 0.270 OD450nm
Mean Value: 0.260 OD450nm
Higher than Cal 0 + 0.100 – Accepted
Calibrator 1000 IU/ml: 2.845 OD450nm
Higher than 1.000 – Accepted

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

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.

The cut-off of the device has been set at 50 IU/ml, and not lower as some other devices present on the market do, in order to assure the highest diagnostic value to the test, in particular when the assay is applied in pregnancy monitoring.

Upon infection, in fact, a part from the very first time of seroconversion, patients develop a strong immunological response to Toxoplasma gondii, far exceeding 50 IU/ml.

Low titer antibodies (below 50 IU/ml) mostly show low avidity to the infective agent and may represent a diagnostic marker of a recent infection, in combination with IgM.

Pregnant women, with antibodies concentrations below 50 IU/ml are by the device considered negative in order to make the clinician consider them "risk" patients and follow them up for both IgG and IgM along pregnancy.

Samples with a concentration higher than 50 WHO IU/ml are considered positive for anti Toxoplasma gondii IgG antibody, surely able to provide immunity against the infection.

This titer is considered the lowest concentration of IgG to provide an effective immunological protection against a second infection of Toxoplasma gondii by NCCLS, USA.

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. When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
3. In the follow-up of pregnancy for *Toxoplasma Gondii* infection a positive result (presence of IgG antibody > 50 IU/ml) should be confirmed to ruled out the risk of a false positive result and a false definition of protection.

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what indicated in the standard prEN 13612.

1. Limit of detection

The limit of detection of the assay has been calculated by means of the 3rd international standard produced by the World Health Organization (WHO).

The limit of detection has been calculated as mean OD450nm Calibrator 0 IU/ml + 5 SD.

The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined in the assay.

OD450nm values

WHO IU/ml	TOXOG.CE Lot # 0503	TOXOG.CE Lot # 0403	TOXOG.CE Lot # 0303
250	0.816	0.853	0.974
100	0.365	0.398	0.445
50	0.209	0.244	0.246
10	0.094	0.125	0.108
Std 0	0.033	0.031	0.056

The assay shows a limit of detection better than 10 IU/ml.

2. Diagnostic Sensitivity:

The diagnostic sensitivity has been tested in a Performance Evaluation trial on panels of samples classified positive by a kit US FDA approved. Positive samples from different stage of *Toxoplasma gondii* Virus infection were tested.

The value, obtained from the analysis of more than 300 specimens, has been > 98%.

3. Diagnostic Specificity:

The diagnostic specificity has been determined on panels of negative samples from not infected individuals, classified negative with a kit US FDA approved.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity.

Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage.

No interference was observed.

Potentially interfering samples derived from patients with different pathologies (mostly ANA, AMA and RF positive) and from pregnant women were tested. No crossreaction was observed.

An overall value > 98% of specificity was found when examined on more than 100 specimens.

4. Precision:

It has been calculated on three Calibrators, examined in 16 replicates in three separate runs with three lots.

Results are reported as follows

TOXOG.CE: lot 0503

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.067	0.066	0.070	0.067
Std.Deviation	0.006	0.005	0.006	0.006
CV %	9.3	7.7	9.0	8.7

Calibrator 50 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.276	0.259	0.268	0.267
Std.Deviation	0.025	0.006	0.010	0.014
CV %	9.1	2.4	3.6	5.0

Calibrator 1000 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.768	2.657	2.707	2.711
Std.Deviation	0.118	0.098	0.101	0.106
CV %	4.3	3.7	3.7	3.9

TOXOG.CE: lot # 0403

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.067	0.065	0.068	0.066
Std.Deviation	0.003	0.004	0.006	0.004
CV %	5.2	6.3	8.3	6.6

Calibrator 50 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.270	0.262	0.265	0.265
Std.Deviation	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.5	3.4	3.1	3.7

Calibrator 1000 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.765	2.652	2.718	2.712
Std.Deviation	0.115	0.101	0.092	0.103
CV %	4.2	3.8	3.4	3.8

TOXOG.CE: lot # 0303

Calibrator 0 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.068	0.067	0.069	0.068
Std.Deviation	0.004	0.004	0.006	0.004
CV %	5.1	6.1	8.0	6.4

Calibrator 50 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.268	0.261	0.265	0.265
Std.Deviation	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.6	3.3	3.2	3.7

Calibrator 1000 IU/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.766	2.651	2.719	2.712
Std.Deviation	0.115	0.100	0.091	0.102
CV %	4.2	3.8	3.3	3.8

The variability shown in the tables above did not result in sample misclassification.

5. Accuracy

The assay accuracy has been checked by the dilution and recovery tests. Any "hook effect", underestimation likely to happen at high doses of analyte, was ruled out up to 4.000 IU/ml.

S. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing may generate some false results.

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.

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 11.

REFERENCES

- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
- Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
- Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978
- Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
- Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
- Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
- Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975
- Camargo, M. E., S. M. Silva, P. G. Leser, and C. H. Granato. 1991. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. Trop. Sp. 33:213-218.
- Cozon, G. J. N., J. Ferrandiz, H. Nebhi, M. Wallon, and F. Peyron. 1998. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy women. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17:32-36
- Gutierrez, J., and C. Maroto. 1996. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? A review. Microbios 87:113-121
- Hedman, K., M. Lappalainen, I. Seppäia, and O. Makela. 1989. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. Infect. Dis. 159:736-740
- Holliman, R. E., R. Raymond, N. Renton, and J. D. Johnson. 1994. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol. Infect. 112:399-408
- Joynson, D. H. M., R. A. Payne, and B. K. Rawal. 1990. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. J. Clin. Pathol. 43:1032-1033
- Korhonen, M. H., J. Brunstein, H. Haario, A. Katnikov, R. Rescaldani, and K. Hedman. 1999. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6:725-728
- Lappalainen, M., P. Koskela, M. Koskiniemi, P. Ammala, V. Hilesmaa, K. Teramo, K. Raivio, J. F. Remington, and K. Hedman. 1993. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J. Infect. Dis. 167:691-697

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 S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) - Italy

CE
0318

TOXO IgG

**Ensayo inmunoenzimático para la
determinación cualitativa/cuantitativa de
anticuerpos IgG frente a
Toxoplasma gondii
en plasma y suero humano**

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

Code: TOXOG.CE
96 pruebas

TOXO IgG

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos IgG frente a *Toxoplasma gondii*, en plasma y suero humanos.

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 contra *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 severas en pacientes inmunocomprometidos, deben ser diferenciadas de otros tipos de trastornos.

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

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

Los pocillos de la placa están recubiertos con antígenos nativos de *T. gondii*, purificados por gradiente de centrifugación con sacarosa e inactivados.

Se añade la muestra diluida, y los anticuerpos IgG contra *T. gondii* presentes en la misma son capturados por los antígenos de la fase sólida.

Después del lavado, en la 2ª incubación, los anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii* son detectados mediante anticuerpos policlonales específicos anti-IgG humana, conjugados con Peroxidasa (HRP).

La enzima capturada en la fase sólida, combinada con la mezcla sustrato/cromógeno, genera una señal óptica proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* presentes en la muestra. Posteriormente, con la ayuda de una Curva de Calibración contra el 3º estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), es posible determinar cuantitativamente los anticuerpos IgG contenidos en la muestra.

D. COMPONENTES.

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

12 tiras de 8 pocillos recubiertos con *T. gondii*, altamente purificado e inactivado por radiaciones gamma en presencia de proteínas del suero bovino.

Las placas están almacenadas en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las mismas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y conservar a 2-8°C.

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

6x2.0 ml/vial. Listo para el uso y curva con código estándar de color, calibrada contra el 3º estándar Internacional producido por la O.M.S. con rangos:

4ml CAL 1 = 0 O.M.S IU/ml
4ml CAL 2 = 50 O.M.S IU/ml
2ml CAL 3 = 100 O.M.S IU/ml
2ml CAL 4 = 250 O.M.S IU/ml
2ml CAL 5 = 500 O.M.S IU/ml
4ml CAL 6 = 1000 O.M.S IU/ml.

Contiene plasma positivo a Toxo IgG, titulado contra el 3º estándar internacional O.M.S. (código: TOXM), caseína al 2%, tampón Citrato de sodio 10 mM pH 6.0+/-0.1, 0.1% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Los estándares son de color azul.

3. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado. Para ser disuelto en el volumen de agua de calidad EIA indicado en la etiqueta. Contiene proteínas del suero bovino fetal, plasma humano positivo a *T. gondii* a 250 IU/ml +/-10% calibrado contra el 3º estándar internacional O.M.S. (código: TOXM), contiene además 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.

4. 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%

5. Conjugado: CONJ

2x8ml/vial. Solución lista para el uso. Codificado con el color rojo. Contiene anticuerpos policlonales anti-IgG humanos conjugados con Peroxidasa (HRP), BSA 5%, tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, además sulfato de gentamicina 0.02% y ProClin 300 0.045% como conservantes.

6. Cromógeno/Substrato. SUBS TMB

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

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

7. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

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

8. Diluyente de muestras: DILSPE

2x60ml/vial. Contiene proteínas del suero de cabra, 2% de caseína, tampón Citrato de sodio 10 mM pH 6.0 +/-0.1, 0.1% de Tween 20, azida sódica al 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. Se utiliza para diluir las muestras.

9. Sellador adhesivo, n° 2

10. 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 (tolerancia+/-1°C).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450 nm (lectura) y filtros 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 indumentos 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.
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.
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 periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 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.
6. Aquellas muestras, cuya concentración de IgG anti-*T. gondii* se sospeche mayor de 1000 IU/ml, deben diluirse a 1:10 o 1:100 antes del uso, con ayuda del Calibrador 0 IU/ml. Las diluciones deben efectuarse en tubos limpios desechables añadiendo 50 µl de la muestra y 450 µl del Cal 0 (1:10), después 50 µl de la dilución 1:10 y 450 µl del Cal 0 (1:100). Mezclar los tubos en el vortex y después proseguir con los pasos indicados en la sección M.

PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos abiertos, en uso por un período de hasta 3 meses.

Microplaca:

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.

Curva de Calibración:

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

Suero Control:

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar delicadamente en el vortex.

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.

Conjugado:

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

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.

Diluyente de muestras :

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

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 ser 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 (etanol 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%.
2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) 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 $\pm 5\%$.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450 nm y de un segundo filtro de 620-630 nm obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda ≤ 10 b) Rango de absorbancia de 0 a ≥ 2.0 , c) Linealidad ≥ 2.0 , reproducibilidad $\geq 1\%$. 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 las 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 pesquaje 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.
3. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico.
4. 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.
5. Disolver el Suero Control liofilizado, como se ha descrito anteriormente.
6. Diluir totalmente la solución de lavado concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente.
7. Dejar los componentes restantes hasta alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar después suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.

- 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.
- Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
- En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
- Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
- Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.
- 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.
El equipo puede usarse tanto para la determinación cuantitativa como cualitativa.

M1. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA:

Ensayos Automatizados.

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. Una vez diluidas las mismas, programar el equipo para dispensar 100 µl de cada una en los pocillos correspondientes.

Este procedimiento puede realizarse además en dos pasos de dilución 1:10 (90 µl Diluyente de Muestras + 10 µl Muestra) en una segunda plataforma de dilución. Después, se recomienda programar el equipo para aspirar 100µl de Diluyente de Muestras y 10µl de la primera dilución en la plataforma, posteriormente dispensar el contenido total en los pocillos correspondientes.

No es necesario diluir el Calibrador ni el Suero Control (ya diluido) pues están listos para el uso.

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

Para las operaciones siguientes, consulte las instrucciones que aparecen a continuación 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.

Ensayo Manual.

- Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución apropiado (ejemplo: 1000 de Diluyente de Muestras+10µl de muestra). No diluir el Panel de Calibración, ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente, con ayuda de un vórtex, todos los componentes líquidos y continuar como se describe a continuación.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar vacíos los pocillos A1 y B1 para el blanco.
- Dispensar 100 µl de Calibradores y 100 µl de Suero Control, por duplicado, después dispensar 100 µl de cada muestra diluida en su pocillo correspondiente.
- 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.

- Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando 350µl/pocillo de solución de lavado diluida, según se indica (section I.3).
- Dispensar 100µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto en A1 y B1, después cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo ha sido añadido en todos los pocillos excepto A1 y B1.

Notas importantes:

Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

Mezclar el Conjugado en el vórtex antes de usarlo!

- Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
- Lavar los pocillos de igual forma que en el paso 5.
- Dispensar 100µl de TMB/H₂O₂ en todos los pocillos, incluidos los del blanco. Controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca por **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

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

- Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco B1 (blanco)).

Notas generales importantes:

- Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
- 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.
- El suero de control (CS) no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

M2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA:

Si se requiere solamente un análisis cualitativo, proceda como se indica a continuación.

Ensayo automatizado:

Proceder según la sección M1.

Ensayo Manual.

- Diluir las muestras 1:101 en un tubo de dilución apropiado (ejemplo: 1000 de Diluyente de Muestras+10µl de muestra). No diluir el Panel de Calibración, ya que los calibradores están listos para el uso. Mezclar cuidadosamente, con ayuda de un vórtex, todos los componentes líquidos y continuar como se describe a continuación.
- Poner el número de tiras necesarias en el soporte de plástico. Dejar vacío el pocillo A1 para el blanco.
- Dispensar 100 µl del Calibrador 0 IU/ml y 100 µl del Calibrador 50 IU/ml por duplicado, y 100 µl del Calibrador 1000 IU/ml sencillo. Después dispensar 100 µl de cada muestra diluida 1:101 en su pocillo correspondiente.
- 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.

- Lavar la microplaca con el lavador automático dispensando y aspirando 350µl/pocillo de solución de lavado diluida, según se indica (section I.3).
- Dispensar 100µl del Conjugado en todos los pocillos, excepto en A1, después cubrir con el sellador. Compruebe que este reactivo de color rojo haya sido añadido en todos los pocillos excepto A1.

Notas importantes:

Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta al dispensar el conjugado. Podría producirse contaminación.

Mezclar el Conjugado en el vórtex antes de usarlo!

- Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.
- Lavar los pocillos de igual forma que en el paso 5.
- Dispensar 100µl de TMB/H₂O₂ en todos los pocillos, incluido el del blanco. Controlar que los reactivos hayan sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**.

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

- Dispensar 100µl de Ácido Sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición del ácido cambia el color de los calibradores positivos, el suero control y las muestras positivas de amarillo a azul.
- Medir la intensidad del color de la solución en cada pocillo, según se indica en la sección I.5, con un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1 (blanco).

N. ESQUEMA DEL ENSAYO.

Método	Operaciones
Calibradores & Control	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
Conjugado	100 µl
2^{da} incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavado	5 ciclos con 20"de remojo o 6 ciclos sin remojo
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 en el análisis cuantitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M 1									
B	BL	CAL4	M 2									
C	CAL1	CAL5	M 3									
D	CAL1	CAL5	M 4									
E	CAL2	CAL6	M 5									
F	CAL2	CAL6	M 6									
G	CAL3	SC	M 7									
H	CAL3	SC	M 8									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra // SC = Suero Control

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

Microplaca

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M 3	M 11									
B	CAL1	M 4	M 12									
C	CAL1	M 5	M 13									
D	CAL2	M 6	M 14									
E	CAL2	M 7	M 15									
F	CAL6	M 8	M 16									
G	M 1	M 9	M 17									
H	M 2	M 10	M 18									

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores //M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas de validación con los controles cada vez que se usa el equipo para verificar si el funcionamiento del ensayo es correcto, según las directivas IVDD 98/79/EC.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros :

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100 DO450nm
Calibrador 0 IU/ml (CAL1)	< 0.150 valor medio DO450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación < 30%
Calibrador 50 IU/ml	DO450nm > DO450nm CAL1 + 0.100
Calibrador 1000 IU/ml	DO450nm > 1.000
Suero Control	250 O.M.S. IU/ml +/-10%

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 > 0.100 DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Calibrador 0 IU/ml > 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 (dispensado de un calibrador positivo en lugar del negativo). 4. no ha existido contaminación del Cal 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 50 IU/ml DO450nm < DO450nm CAL1 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 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.
Calibrador 1000 IU/ml < 1.000 DO450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 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.
Suero Control Valor distinto al esperado	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador son correctos. 4. no ha ocurrido contaminación externa de los controles. 5. el Suero Control ha sido disuelto con el volumen correcto indicado en la etiqueta Si se indica un error, el ensayo debe repetirse tras eliminar la causa del mismo. En caso de no encontrar un error, procédase como sigue: a) si se obtiene un valor hasta +/-20%: la precisión global del laboratorio podría no permitir alcanzar +/-10% del valor esperado. Comunicar el problema al responsable para aceptar ó rechazar este resultado. b) si se obtiene un valor superior a +/-20%: en este caso el test es inválido y hay que avisar al servicio de atención al cliente de DiaPro

De presentarse alguno de los problemas anteriores, después de comprobar, avisar al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

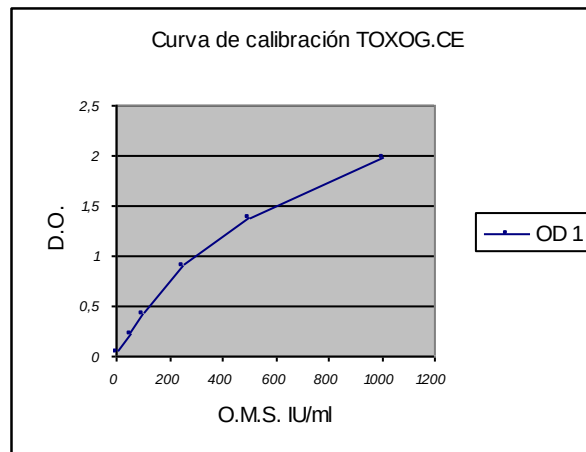
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

P. RESULTADOS.

P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un sistema de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm (se sugiere interpolar 4 parámetros). Posteriormente, calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgG contra el *T. gondii* presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:



Nota Importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm para los Calibradores 0 y 50 IU/ml, después comprobar que el ensayo es válido.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar para el método cualitativo: (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11).

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

Calibrador 0 IU/ml: 0.020 – 0.024 DO450nm
Valor medio : 0.022 DO 450nm
Menor de 0.150 – Válido

Calibrador 50 IU/ml: 0.250 – 0.270 DO 450nm
Valor medio : 0.260 DO 450nm
Mayor que Cal 0 + 0.100 – Válido

Calibrador 250 IU/ml: 2.845 DO 450nm
Mayor que 1.000 – Válido

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Debe ponerse particular atención a la interpretación de los resultados en el seguimiento del embarazo, debido a que la infección por *T. gondii* puede provocar malformaciones en el neonato.

El cut-off del producto ha sido posicionado a 50 IU/ml, y no debajo de esta, en modo de asegurar al test un mayor valor diagnóstico, en particular sobre todo cuando el dosaje es aplicado durante el monitoreo de las mujeres embarazadas. Debido a la infección, de echo a parte del primerísimo periodo de seroconversión, el paciente desarrolla una fuerte respuesta inmunológica contra el agente infectante, que sobrepasa de bastante las 50 IU/ml.

Anticuerpos con título bajo (debajo de 50 IU/ml) muestran prevalentemente una baja reactividad contra el *Toxoplasma gondii* y pueden así representar un marcador diagnóstico de una reciente infección, en combinación con los IgM.

Las muestras con una concentración menor de 50 OMS IU/ml son consideradas negativas a anticuerpos IgG contra *Toxoplasma gondii*, en modo de inducir al médico a considerar tales sujetos 'a riesgo' y de proseguir el monitoreo sea de los IgG que de los IgM durante el embarazo.

Las muestras con una concentración mayor de 50 OMS IU/ml se consideran positivas a anticuerpos IgG contra el Virus Toxoplasma gondii y del punto de vista inmunológico protegidos contra la infección. Este título es considerado, según NCCLS Estados Unidos, la menor concentración de IgG que ofrece una protección inmunológica efectiva contra una segunda infección por *Toxoplasma gondii*.

Notas importantes:

1. 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.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
3. En el monitoreo de infección por *Toxoplasma Gondii* durante el embarazo, un resultado positivo (presencia de anticuerpos IgG > 50 IU/ml) debe ser confirmado para eliminar cualquier riesgo de falso positivo o falsa definición de protección.

R. FUNCIONAMIENTO.

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo establecido en el estándar prEN 13612.

1. Límite de detección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado por medio del 3^{er} estándar internacional producido por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S).

El límite de detección ha sido calculado como valor medio de DO450nm del Calibrador 0 OMS U/ml + 5 SD.

La siguiente tabla muestra los valores medios de DO450nm del estándar, diluido en plasma negativo y examinado en el ensayo.

Valores DO450nm			
O.M.S. IU/ml	TOXOG.CE Lote # 0503	TOXOG.CE Lote # 0403	TOXOG.CE Lote # 0303
250	0.816	0.853	0.974
100	0.365	0.398	0.445
50	0.209	0.244	0.246
10	0.094	0.125	0.108
Est 0	0.033	0.031	0.056

El ensayo demuestra un límite de detección superior a 10 IU/ml.

2. Sensibilidad Diagnóstica:

La sensibilidad diagnóstica se ha estudiado en un ensayo clínico externo utilizando paneles de muestras, clasificadas como positivas mediante un equipo de referencia US FDA. Se probaron muestras positivas correspondientes a diferentes etapas de la infección por *Toxoplasma gondii*.

El valor obtenido del análisis de más de 300 muestras fue > 98%.

3. Especificidad Diagnóstica:

La especificidad diagnóstica ha sido determinada en el mismo centro, utilizando paneles de muestras provenientes de individuos sanos, clasificadas como negativas mediante un equipo de referencia US FDA.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrate, 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 analizadas 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.

Se analizaron muestras de potencial interferencia derivadas de pacientes con diversas patologías (mayormente positivos a

ANA, AMA y RF) y de mujeres embarazadas. No se observaron reacciones cruzadas.

Se obtuvo un valor de especificidad total > 98% al examinar más de 100 muestras.

4. Precisión:

Ha sido calculada a partir de tres Calibradores examinados en 16 réplicas en tres corridas separadas, para 3 lotes.

Los resultados son los siguientes:

TOXOG.CE: lote 0503

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.067	0.066	0.070	0.067
Desviación estándar	0.006	0.005	0.006	0.006
CV %	9.3	7.7	9.0	8.7

Calibrador 50 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.276	0.259	0.268	0.267
Desviación estándar	0.025	0.006	0.010	0.014
CV %	9.1	2.4	3.6	5.0

Calibrador 1000 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	2.768	2.657	2.707	2.711
Desviación estándar	0.118	0.098	0.101	0.106
CV %	4.3	3.7	3.7	3.9

TOXOG.CE: lote # 0403

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.067	0.065	0.068	0.066
Desviación estándar	0.003	0.004	0.006	0.004
CV %	5.2	6.3	8.3	6.6

Calibrador 50 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.270	0.262	0.265	0.265
Desviación estándar	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.5	3.4	3.1	3.7

Calibrador 1000 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	2.765	2.652	2.718	2.712
Desviación estándar	0.115	0.101	0.092	0.103
CV %	4.2	3.8	3.4	3.8

TOXOG.CE: lote # 0303

Calibrador 0 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1 ^{ra} corrida	2 ^{da} corrida	3 ^{ra} corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.068	0.067	0.069	0.068
Desviación estándar	0.004	0.004	0.006	0.004
CV %	5.1	6.1	8.0	6.4

Calibrador 50 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	0.268	0.261	0.265	0.265
Desviación estándar	0.012	0.009	0.008	0.010
CV %	4.6	3.3	3.2	3.7

Calibrador 1000 IU/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor promedio
DO 450nm	2.766	2.651	2.719	2.712
Desviación estándar	0.115	0.100	0.091	0.102
CV %	4.2	3.8	3.3	3.8

La variabilidad mostrada en las tablas no dió como resultado una clasificación errónea de las muestras.

5. Exactitud.

La exactitud del ensayo ha sido comprobada mediante diluciones y pruebas de recuperación. Cualquier "efecto gancho", estimación errónea que puede presentarse a elevadas dosis del analita, no se manifiesta hasta 4.000 IU/ml.

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 11.

S. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

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

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.

BIBLIOGRAFÍA.

- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971
- Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.José, Toronto.
- Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978
- Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
- Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
- Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
- Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975
- Camargo, M. E., S. M. Silva, P. G. Leser, and C. H. Granato. 1991. Aidez de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. Trop. Sp. 33:213-218.
- Cozon, G. J. N., J. Ferrandiz, H. Nebhi, M. Wallon, and F. Peyron. 1998. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy women. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17:32-36
- Gutierrez, J., and C. Maroto. 1996. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? A review. Microbios 87:113-121

- Hedman, K., M. Lappalainen, I. Seppä, and O. Makela. 1989. Recent primary toxoplasma infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. Infect. Dis. 159:736-740
- Holliman, R. E., R. Raymond, N. Renton, and J. D. Johnson. 1994. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol. Infect. 112:399-408
- Joynson, D. H. M., R. A. Payne, and B. K. Rawal. 1990. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. J. Clin. Pathol. 43:1032-1033
- Korhonen, M. H., J. Brunstein, H. Haario, A. Katnikov, R. Rescaldani, and K. Hedman. 1999. A new method with general diagnostic utility for the calculation of immunoglobulin G avidity. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6:725-728
- Lappalainen, M., P. Koskela, M. Koskiniemi, P. Ammala, V. Hilesmaa, K. Teramo, K. Raivio, J. F. Remington, and K. Hedman. 1993. Toxoplasmosis acquired during pregnancy: improved serodiagnosis based on avidity of IgG. J. Infect. Dis. 167:691-697

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 marcado 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

CE
0318

