



ENZYWELL

TOXOPLASMA IgM

REF 91041 (96 tests)

Manufactured by: DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) - Italy



INDICE / INDEX

1. UTILIZZAZIONE / INTENDED USE / UTILISATION
2. INTRODUZIONE / SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST / INTERET CLINIQUE
3. PRINCIPIO DEL METODO / PRINCIPLE OF THE TEST / PRINCIPE
4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI / KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION / CONTENU DU COFFRET ET PREPARATOIN DES REACTIFS
5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI / STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS / MODALITE DE CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS
6. PRECAUZIONI / PRECAUTIONS / PRECAUTIONS D'UTILISATION
7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE / TYPE AND STORAGE OF SAMPLE / TYPE D'ECHANTLLON
8. PROCEDIMENTO / TEST PROCEDURE / MODE OPERATOIRE
9. SCHEMA DELLA PROVA/ SCHEME OF TEST PROCEDURE / SCHEMA D'ANALYSE
10. VALIDAZIONE DEL TEST / TEST VALIDATION / VALIDATION DU TEST
11. INTERPRETAZIONE DEL TEST / INTERPRETATION OF RESULTS / INTERPRETATION DES RESULTATS
12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA /LIMITATIONS OF THE PROCEDURE / LIMITES DE LA METHODE
13. SPECIFICITA' ANALITICA / ANALYTICAL SPECIFICITY / SPECIFICITE ANALYTIQUE
14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA / DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY / SENSIBLITE ET SPECIFICITE DIAGNOSTIQUE
15. PRECISIONE / PRECISION
16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO / "TROUBLE SHOOTING"
17. BIBLIOGRAFIA / REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE



ISTRUZIONI PER L'USO

ENZYWELL TOXOPLASMA IgM

REF 91041

(Italiano)

1. UTILIZZAZIONE

KIT IMMUNOENZIMATICO A CATTURA PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DEGLI ANTICORPI IgM ANTI TOXOPLASMA GONDII NEL SIERO UMANO. DA UTILIZZARE COME AUSILIO ALLA DIAGNOSI DELL'INFEZIONE DA TOXOPLASMA.

2. INTRODUZIONE

Il *Toxoplasma gondii* è un protozoo ubiquitario capace di infettare tutte le specie di mammiferi. Nell'uomo studi sierologici indicano che una alta percentuale della popolazione adulta è stata infettata da questo parassita. La malattia è particolarmente seria in pazienti immunodepressi durante la gestazione in quanto viene trasmessa dalla madre al feto. Per quest'ultimo motivo è importante conoscere il titolo anticorpale prima dell'inizio della gravidanza e nei soggetti non immuni controllare con frequenti analisi se si verifica sieroconversione. La diagnosi sierologica di Toxoplasmosi può essere effettuata dosando le IgM specifiche in quanto questi anticorpi abbinati ai sintomi clinici hanno un considerevole significato diagnostico.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test per il dosaggio delle IgM anti *Toxoplasma* si basa sul principio della cattura di queste immunoglobuline e successiva rivelazione di quelle specifiche sfruttando la loro capacità di legare un antigene coniugato a perossidasi. La cattura si effettua con anticorpi monoclonali legati alla fase solida (pozzetti di microtiter). L'antigene è costituito da tachizoiti purificati, inattivati e sonicati marcati con perossidasi legata a monoclonali specifici anti *Toxoplasma*.

4. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- I reagenti sono sufficienti per 96 determinazioni.
- **Portare a temperatura ambiente prima dell'uso.**

MT PLATE *MICROPIASTRA*. 12x8 pozzetti sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-IgM umane.

Uso: Aprire l'involucro della piastra dalla parte opposta del codice (M seguito dal numero di lotto) che serve per la sua identificazione; prendere il supporto e gli strips necessari. Riporre gli altri non utilizzati nella busta di politene con il gel di silice; fare uscire l'aria e sigillare premendo sulla chiusura.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO (1.6 mL)

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

CONTROL CUT OFF CUT-OFF (2.5 mL)

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

Colore: il colore è proporzionale al titolo anticorpale.

Ag ANTIGENE. Liofilo x 6 fiale.

Contenuto: *Toxoplasma gondii* purificato, in tampone fosfato contenente fluido ascitico di topo e lattosio.

Preparazione: Ricostituire con il volume di coniugato indicato in etichetta agitando per inversione.

CONJ CONIUGATO.

Contenuto: anticorpi monoclonali marcati con perossidasi, in soluzione di tampone fosfato contenente fenolo 0,05% e Bronidox 0,02%.

Preparazione: pronto all'uso.

L'immunocomplesso deve essere preparato 45 minuti circa prima dell'uso.

CONTROL - IgM CONTROLLO NEGATIVO (PF93900) (1.6 mL) INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Siero umano diluito in tampone fosfato 0.01 mol/L con BSA 1% e sodio azide 0,09%, liquido, pronto all'uso senza ulteriore diluizione.

WASH BUF 10x TAMPONE DI LAVAGGIO 10X (PF93603). 1 x 100 mL. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Soluzione salina tamponata (PBS) concentrata 10 volte contenente Brij 0.5%.

Preparazione: Diluire il volume richiesto 1:10 con acqua distillata per ottenere il tampone di lavaggio pronto all'uso. Se sono presenti cristalli, discioglierli a 37°C prima di diluire.

SAMP DIL DILUENTE 2 (PF93611). 1 x 100 mL. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Da utilizzare per la diluizione dei campioni.

Contenuto: Soluzione proteica in tampone fosfato con sodio azide 0,09% più colorante (metilarancio).

SUBS TMB SUBSTRATO (PF93619). 12 mL. Pronto all'uso. INTERCAMBIABILE FRA LOTTI

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0,26 mg/mL ed H₂O₂ 0,01% stabilizzati in tampone citrato 0,05 mol/L (pH 3,8).

H₂SO₄ 0.3 M SOLUZIONE BLOCCANTE (PF93602). 1 x 16 mL.

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

PELLICOLA PROTETTIVA (2).

BUSTA DI POLIETILENE (1).

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO.

- Incubatore a 37°C
- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 or 450/620 nm, con linearità fino ad OD >= 2,000)
- Lavatore di micropiastre (non indispensabile) capace di dispensare volumi compresi tra 225-375 µl
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette. Capaci di prelevare accuratamente 10, 100, 1000 ul di soluzione
- Guanti mono-uso
- Contaminuti
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti
- Carta assorbente

5. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C.

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I Reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

REAGENTE	CONDIZIONI
MICROPIASTRA	5 settimane 2/8°C busta di polietilene
CONTROLLI	5 settimane 2/8°C
CONIUGATO	5 settimane 2/8°C
ANTIGENE RICOSTITUITO	15 gg 2/8°C
SUBSTRATO	fino alla scadenza a 2/8°C, 1 settimana a 15/30°C, al buio
DILUENTE CAMPIONI	fino alla scadenza a 2/8°C
WASH BUFFER	p.uso 2 settimane 2/8°C, 5 gg 15/30 °C
STOP SOLUTION	fino alla scadenza a 2/8°C

6. PRECAUZIONI

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

Attenzione:

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HbsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV.. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana

deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il tampone di lavaggio contiene detergenti
 - b) Il coniugato contiene fenolo
 - c) Il substrato è acido
 - d) I controlli contengono Sodio Azide (0.09%) che, con piombo e rame può formare depositi altamente esplosivi di metallo azidi: diluire con molta acqua per la sua eliminazione

Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Le apparecchiature non disposable devono essere sterilizzate dopo l'uso, ponendo preferibilmente in autoclave per 1 h a 121°C; i disposables devono essere autoclavati o inceneriti.
4. L'acido solforico contenuto nello Stop Solution e l'acido cloridrico usato per lavare la vetreria sono corrosivi; tali sostanze devono essere adoperate con cautela. In caso di contatto con la pelle o gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
5. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.
6. Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere pulita, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per pulire eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

1. Prima dell'uso, portare tutti i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (18-30°C). Riporre i reagenti alla temperatura di conservazione raccomandata immediatamente dopo l'uso. **E' importante disporre di una corretta termostatazione per l'incubazione delle strip. Controllare che il termostato non scenda sotto i 35°C e non salga oltre i 39°C.**
Aprire la busta contenente le strip dopo almeno mezz'ora a temperatura ambiente.
2. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dare luogo a risultati errati.
3. Non modificare la Procedura, né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori o da altri lotti, a meno che non sia specificamente riportato che il reagente è intercambiabile fra lotti. Non ridurre i tempi di incubazione raccomandati.
4. Tutta la vetreria da utilizzare nel test deve essere lavata accuratamente con acido cloridrico 2M e sciacquata con acqua distillata o deionizzata.
5. Non esporre i reagenti a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e le fasi di incubazione.
6. Evitare che i pozzetti si secchino durante il test.
7. Evitare la contaminazione incrociata fra reagenti. E' importante adoperare delle pipette "dedicate" per l'uso.
8. Evitare di toccare il bordo del pozzetto con il coniugato. Non soffiare sulle micropiastre.
9. I dosaggi immunoenzimatici possono talvolta presentare un particolare effetto sul bordo ("edge effect"); si può minimizzare tale effetto aumentando l'umidità durante le fasi di incubazione. Le piastre devono essere coperte con i copripiastre ed incubate a 37°C o in bagnomaria usando un sostegno per le piastre, o in incubatore. In alternativa, le piastre si possono incubare in un analizzatore adatto. Per ulteriori dettagli consultare l'apposito manuale operativo dello strumento. Non si possono utilizzare incubatori a CO₂.
10. Prima di leggere la piastra, assicurarsi che il fondo della piastra sia pulito ed asciutto e che non ci siano bolle d'aria sulla superficie del liquido.
11. Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, siero non completamente coagulato o campioni che presentano inquinamento microbico.
12. L'utilizzo del kit su strumenti automatici deve essere validato dall'utilizzatore.
13. Leggere il manuale operativo relativo a qualsiasi strumento utilizzato, ed in particolare con riferimento ai seguenti punti:
 - installazione e requisiti particolari
 - principio operativo, istruzioni, precauzioni, rischi
 - specifiche del produttore e performance dello strumento

- manutenzione e assistenza tecnica.

7. TIPO DI CAMPIONE E CONSERVAZIONE

Il tipo di campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato con appropriati accorgimenti come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C per periodi maggiori a -20°C e può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. I campioni scongelati devono essere agitati con cura prima del dosaggio. L'inattivazione al calore può fornire risultati erranei. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati erranei.

Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non dovrebbero essere utilizzati. Se non è possibile il prelievo di un campione fresco, i campioni dovrebbero essere chiarificati mediante filtrazione (0,45 µm) o centrifugazione (3000 rpm x 10').

Il test non è applicabile a plasma umano.

8. PROCEDIMENTO

- Preparare le strip necessarie.
- Preparare il tampone di lavaggio diluendo il Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Preparare l'antigene ricostituendo il liofilo con il coniugato (volume indicato in etichetta).

Diluire i campioni 1:101 dispensando 10 µL di siero in 1 mL di diluente, distribuire 100 µL di ciascun campione diluito, per pozzetto (è preferibile effettuare l'analisi in duplicato). In uno strip porre i controlli NON DILUITI i (100 µL per pozzetto). Il requisito minimo indispensabile è di 1 controllo negativo, 2 cut-off e 1 positivo.

Prevedere un pozzetto libero per effettuare il bianco usando solo 100 µL della miscela substrato.

Si coprono i pozzetti con la pellicola protettiva e si pone ad incubare per 45 min. a 37°C. Dopo 4 lavaggi della durata di 30 secondi ciascuno (300 µl) si aggiungono 100 µL dell'immunocomplesso (Antigene/anticorpi monoclonali anti Toxoplasma marcati con Perossidasi) per ciascun pozzetto e si pone di nuovo ad incubare per 45 min. a 37°C coprendo i pozzetti con la pellicola protettiva. Si lava di nuovo la piastra per 4 volte come descritto sopra, quindi si distribuisce il Substrato, 100 µL/pozzetto. Dopo 15 min. a temperatura ambiente si blocca la reazione enzimatica con 100 µL di Stop Solution. Si legge la Assorbanza (O.D.) a 450 nm o 450/620 nm entro 30 min.

9. Schema del protocollo di prova per TOXOPLASMA IgM

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

-
Incubare 45 min. a 37°C

-
Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 2 Mettere 100 µL di immunocomplesso per pozzetto

-
Incubare 45 min. a 37°C

-
Lavare 4 volte (300 µl)

STEP 3 Mettere 100 µL di Substrato per pozzetto

-
Incubare 15 min. a t.a.

STEP 4 Aggiungere 100 µL di Stop Solution

-
Leggere l'O.D. a 450 nm entro 30 min.

10. VALIDAZIONE DEL TEST

Togliere il valore del bianco (<= 0.150) a tutte le altre letture. I valori in O.D. del siero di controllo Cut-off devono essere entro il 25% del valore medio se eseguito in triplicato. Scartare eventualmente il valore aberrante e ricalcolare la media. Il positivo deve avere O.D. pari almeno a 1.5 volte il Cut-off. Il rapporto fra Negativo e Cut-off deve essere <=0.6. La DO del cut-off deve essere >= 0.2 a 450 nm e >= 0.16 a 450/620 nm.

11. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Risultati qualitativi

Se il valore dell'assorbanza del campione è superiore al Cut-off il campione risulta positivo per la presenza di IgM specifiche per l'antigene.

Calcolare il rapporto fra il valore della D.O. del campione in esame e quello del Cut-off (INDEX).

Il campione sarà giudicato:

Positivo: quando il rapporto è > 1.2 .

Dubbio: $= \pm 20\%$ del Cut-off.

Negativo: quando il rapporto è < 0.8 .

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

12. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

L'uso della metodologia immunoenzimatica "a cattura", ci pone al riparo da possibili risposte aspecifiche. Comunque i risultati del dosaggio devono essere interpretati con cautela e convalidati da valutazioni cliniche ed ulteriori prove diagnostiche.

Sieri di pazienti che si trovano in una fase precoce o tardiva della malattia, potrebbero dare un risultato ripetutamente negativo vicino al valore soglia del Cut-off. In tali casi si raccomanda di verificare il risultato, dosando un nuovo campione prelevato ad un intervallo di 7-10 giorni dal primo.

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche.

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 53 campioni di sieri contenuti potenziali interferenti:

- Anticorpi Antinucleo (ANA) (n=9)
- Fattore Reumatoide (n=6)
- Anticorpi eterofili (n=3)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubina (n=8)
- Trigliceridi (n=9)

in nessun caso si sono osservate interferenze

14. SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione clinica esterna, sono stati testati 357 campioni provenienti dalla routine e 68 provenienti da sieroteca. I campioni sono stati testati in confronto con un altro metodo commerciale immunoenzimatico; i casi discordanti venivano testati con la tecnica IFA dopo assorbimento degli anticorpi IgG (Test di Remington). I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

		RIFERIMENTO	
		+	-
+		63	4
DIESSE	-	1	357

Il kit Enzywell ha una sensibilità del 98.4% ed una specificità del 98.9%.

15. PRECISIONE

Precisione nella prova:

<i>Campione</i>	<i>TXM 1</i> (<i>Negativo < Cut Off</i>)	<i>TXM 2</i> (<i>Positivo > Cut Off</i>)	<i>TXM 3</i> (<i>Positivo</i>)	<i>Cut Off</i>	<i>Controllo</i> <i>Positivo</i>
<i>n (repliche)</i>	24	24	24	12	12
<i>O.D.</i>	0.21	0.56	1.42	0.28	0.95
<i>CV%</i>	6	6	5	12	7

Precisione tra prove:

	<i>Index</i>	
	<i>Media</i>	<i>CV%</i>
Controllo Pos.	3,8	8
TXM1	0,8	15
TXM2	1,7	10
TXM3	4,4	10

Precisione fra lotti:

<i>Campione</i>	<i>Index</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lot n. 159</i>	<i>Lot n. 160</i>	<i>Lot n. 161</i>		
TXM1	0,4	0,5	0,5	0,5	12
TXM2	1,8	1,5	1,2	1,5	20
TXM3	3,0	3,8	3,6	3,5	12

16. GUIDA DEI PROBLEMI DI UTILIZZO

PROBLEMA	POSSIBILI FONTI DI ERRORE	AZIONI DA INTRAPRENDERE
Seduta invalida (tutti negativi)	Uno o più reagenti non sono stati aggiunti oppure sono stati aggiunti in ordine errato	Controllare nuovamente la procedura. Controllare se qualche reagente non è stato aggiunto. Ripetere il test.
	Piastra non reattiva	Controllare il codice sulla busta della piastra (vedi informazioni tecniche per il codice corretto).
		Controllare la presenza di umidità nella piastra inutilizzata. (Il gel di silice deve essere giallo pallido) Ripetere il test.
Seduta invalida (tutti positivi)	Inquinamento del substrato	Prelevare una nuova aliquota del substrato.
	Lavaggio inadeguato	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
Scarsa precisione	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Aspirazione inadeguata dei pozzetti	Assicurarsi del buon funzionamento del lavatore
	Errore del pipettamento	Controllare il funzionamento della pipetta
	Aggiunta dei reagenti troppo lenta	Evitare l'essiccamento della piastra dopo il lavaggio. Aggiungere i reattivi immediatamente.
	Presenza di bolle d'aria	Evitare la formazione di bolle d'aria durante il pipettamento
	Percorso ottico non limpido	Controllare la fonte luminosa per la presenza di sporco. Pulire il fondo della piastra con fazzoletto di carta.
Insufficiente sviluppo di colore	Tempo o temperatura di incubazione non corretto	Verificare il monitoraggio della temperatura ed il tempo di incubazione
		Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
	Substrato aggiunto in volume inadeguato	Controllare il funzionamento della pipetta.





INSTRUCTIONS FOR USE

**ENZYWELL
TOXOPLASMA IgM**

REF 91041

(English)

1. INTENDED USE

IMMUNOENZYMATIC CAPTURE METHOD FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgM-CLASS ANTIBODIES TO TOXOPLASMA GONDII IN HUMAN SERUM, AS AN AID IN THE DIAGNOSIS OF TOXOPLASMA INFECTION.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Toxoplasma gondii is a ubiquitous protozoa which causes infection in all mammalian species. In man, serological studies have shown that a high percentage of the adult population has been infected by this parasite. The disease is particularly dangerous in immunodepressed patients during pregnancy, as it is transmitted from mother to fetus.

For this reason it is important to determine the antibody titer before the beginning of pregnancy if possible; those subjects who do not present immunity should be followed up with frequent analyses to check for serum conversion.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The test for the assay of Toxoplasma IgM is based on the principle of the capture of these immunoglobulins and the subsequent identification of those which are specific, making use of their ability to bind an antigen conjugated to peroxidase (1-4). The capture is performed using monoclonal antibodies bound to the solid phase (microtiter wells). The antigen is composed of purified, inactivated and sonicated tachyzoites labelled with peroxidase bound to specific anti Toxoplasma monoclonal antibodies (1-4).

4. KIT CONTENTS AND REAGENT PREPARATION

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

MT PLATE *MICROPLATE*. 12 x 8 wells coated with anti-human IgM monoclonal antibodies.

Use: open the package at the opposite end from the code (M followed by the lot number) which is useful for its identification, remove the support and strips to be used from the foil package, and place the unused strips in the polythene bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure.

CONTROL + *POSITIVE CONTROL (1 x 1.6 mL)*

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

CONTROL CUT OFF *CUT OFF CONTROL (1 x 2.5 mL)*

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

Colour: the colour is proportional to the relative antibody titer.

Ag *ANTIGEN*. Freeze-dried powder x 6 vials.

Contents: Purified Toxoplasma gondii in Phosphate buffer containing mouse ascitic fluid and lactose.

Preparation: reconstitute with the conjugate volume shown on the label, mixing by inversion.

CONJ *CONJUGATE*.

Contents: monoclonal antibodies labelled with Peroxidase, in phosphate buffer solution containing phenol 0.05% and Bronidox 0,02%.

Preparation: ready for use.

The immunocomplex should be prepared about 45 min. before use.

CONTROL - IgM NEGATIVE CONTROL (PF93900) (1 x 1.6 mL) INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Contents: Diluted human serum in Phosphate buffer 0.01 mol/L with BSA 1% and sodium azide 0.09%, liquid, ready for use without further dilution.

WASH BUF 10x WASH BUFFER 10X (PF93603). 1 x 100 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Contents: Phosphate buffered saline, concentrated 10 times; contains Brij 0.5% .

Preparation: dilute the required volume 1:10 with distilled water in order to obtain the washing buffer ready for use. If crystals are present, they should be dissolved at 37°C before dilution.

SAMP DIL DILUENT 2 (PF93611). 1 x 100 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

To be used to dilute samples.

Contents: Proteic solution in phosphate buffer with sodium azide 0,09% containing methyl orange as dye.

SUBS TMB SUBSTRATE (PF93619). 12 mL. Ready for use. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and hydrogen peroxide 0.01% stabilised in citrate buffer 0.05 mol/L (pH 3.8).

H₂SO₄ 0.3 M STOP SOLUTION (PF93602). 1x16 mL. INTERCHANGEABLE BETWEEN LOTS

H₂SO₄ 0.3 mol/L, in solution ready for use.

ADHESIVE FILMS (2).

POLYTHENE BAG (1).

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED.

- Incubator at 37°C
- Microplate reader (wave length 450 or 450/620 nm, with linearity up to OD >= 2000)
- Microplate washer (preferable) able to dispense volumes in the range 225-375 µl
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 10, 100, 1000 µl solution
- Disposable gloves
- Timer
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials
- Absorbent tissue.

5. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C.

The expiry date is printed on each component and on the box label.

Reagents have a limited stability after opening and/or preparation

REAGENT	CONDITIONS
Microplate	5 weeks at 2/8°C, polythene bag
Control s	5 weeks at 2/8°C
Conjugate	5 weeks at 2/8°C
Reconstituted antigen	15 days at 2/8°C
Substrate	until the expiry date at 2/8°C, 1 week at 15-30°C in the dark
Sample Diluent	until the expiry date at 2/8°C
Wash Buffer	2 weeks at 2/8°C, 5 days at 15/30°C.
Stop Solution	until the expiry date at 2/8°C

6. PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY.

Caution:

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HbsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The Wash Buffer contains detergents
 - b) The conjugate contains phenol
 - c) The substrate is acid
 - d) The controls contain 0.09% Sodium Azide which can react with lead and copper in plumbing forming highly explosive deposits of metal azides; dilute with large amounts of water to eliminate.

If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.
3. Non-disposable apparatus should be sterilized after use. The preferred method is to autoclave for 1 h at 121°C; disposables should be autoclaved or incinerated.
4. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If they come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
5. Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
6. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical precautions

1. Allow all reagents and samples to come to room temperature (18-30°C) before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature. **It is important to work at the correct temperature. Check that the thermostat does not go below 35°C or over 39°C.** Open the envelope containing the strips after at least ½ hr at room temperature.
2. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
3. Do not modify the Test Procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionized water.
5. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
6. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
7. Care must be taken not to cross-contaminate reagents. It is important that pipettes are dedicated for exclusive use with the various reagents.
8. Care should be taken to avoid touching or splashing the rim of the well with conjugate. Do not "blow-out" from microplates.
9. Enzyme immunoassays can occasionally exhibit an "edge effect" which must be minimized by increasing the humidity during incubation steps. Plates must be covered with their covers and incubated at 37°C either in a water bath with a rack or float to support the plates if necessary, or in an incubator. Alternatively, plates can be incubated in an approved analyzer. See the appropriate operating manual for further details. CO₂ incubators must not be used.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry, and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Use of highly hemolyzed samples, incompletely clotted sera, or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
12. The use of the kit with automated equipment has to be validated by the user.
13. For each instrument used, read the manufacturer's instructions manual carefully to obtain additional information on the following points:
 - installation and particular requisites
 - operating principles, instructions, precautions and risks
 - manufacturer's specifications and instrument performance
 - servicing and maintenance.

7. TYPE AND STORAGE OF SAMPLE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at

-20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Defrosted samples must be carefully mixed before the test. Heat inactivation can lead to erroneous results. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric or contaminated samples should be avoided. If a new sample cannot be obtained, such samples should be clarified by filtration (0.45 µm) or centrifugation (3000 rpm x 10').

The test is not applicable to human plasma.

8. TEST PROCEDURE

Manual Technique

- Prepare the required number of strips.
- Prepare the washing buffer by diluting the Wash Buffer 10x (100 mL + 900 mL H₂O).
- Prepare the immunocomplex by adding the Conjugate to the antigen (volume shown on the label).

Dilute samples 1:101 distributing 10 µL of serum into 1 mL of diluent. Dispense 100 µL of each diluted sample per well (duplicate testing is recommended). Place UNDILUTED controls in a strip (100 µL in each well). The minimum requisite is 1 negative control, 2 cut-off and 1 positive control. Leave one well for the blank, performed using 100 µL of the substrate mixture.

Wells are covered with protective film and incubated for 45 minutes at 37°C. After washing four times for 30 seconds (300 µl), add 100 µL of the immunocomplex (Antigen-anti *Toxoplasma gondii* monoclonal antibodies labelled with peroxidase) to each well and incubate again for 45 minutes at 37°C, covering the wells with the protective film. The plate is washed again 4 times, as described above. Finally, the substrate is distributed, 100 µL/well.

After 15 minutes at room temperature the enzymatic reaction is stopped with 100 µL of Stop Solution.

The adsorbance (O.D.) is read at 450 nm or 450/620 nm within 30 min.

9. TEST PROCEDURE FOR TOXOPLASMA IgM

STEP 1 Place 100 µL of diluted sample/controls in the wells of the strips.

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µl)

STEP 2 Add 100 µL of immunocomplex to each well

-

Incubate for 45 min. at 37°C

-

Wash 4 times (300 µl)

STEP 3 Add 100 µL of Substrate to each well

-

Incubate for 15 min. at R.T.

STEP 4 Add 100 µL of Stop Solution

-

Read absorbance at 450 nm within 30 min

10. TEST VALIDATION

Subtract the value of the blank (≤ 0.150) from all the other readings. The O.D. values of the control Cut-off serum tested in triplicate must be within 25% of the mean value. Disregard any abnormal value and recalculate the mean. The Positive control must have an O.D. at least 1.5 times that of the Cut-off serum. The ratio between Negative Control and Cut-off must be ≤ 0.6 . The OD Cut-off must be ≥ 0.2 at 450 nm and ≥ 0.16 at 450/620 nm.

11. INTERPRETATION OF THE RESULTS

Qualitative results

If the adsorbance of the sample is higher than that of the Cut-off, the sample is positive for the presence of specific IgM. Calculate the ratio between the O.D. value of the sample and that of the Cut-off (INDEX).

The sample is considered:

Positive: if the ratio is > 1.2 .

Doubtful: $\pm 20\%$ of the Cut-off.

Negative: if the ratio is < 0.8 .

If the result is doubtful, repeat the test. If it remains doubtful, collect a new serum sample.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The use of the immunoenzymatic "capture" method precludes possible non-specific responses. However, the results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic procedures. Samples giving a repeatedly negative result close to the Cut-off value, may be seen in patients in an early or late stage of the disease. In such cases, a confirmation of the result is recommended, by testing a new sample drawn from the same patient at 7-10 days interval from the first sample. Results must always be interpreted together with an evaluation of the clinical picture and other diagnostic data.

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

53 serum samples ed containing potential interfering substances were test:

- Antinuclear antibodies (ANA) (n=9)
- Rheumatoid factor (n=6)
- Heterophile antibodies (n=3)
- Cytomegalovirus IgM (n=18)
- Bilirubin (n=8)
- Triglycerides (n=9).

No interference was noted in any case.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In a clinical trial performed in a hospital laboratory, 357 samples from the routine practice and 68 from the serum collection were analysed with the present kit in parallel with another commercial immunoenzymatic kit. All discordant samples were analysed in the IFA technique after absorption of the IgG (Remington's test). The results are reported in the following table.

		REFERENCE METHOD	
		+	-
DIESSE	+	63	4
	-	1	357

The Enzywell kit has a sensitivity of 98.4% and a specificity of 98.9%.

15. PRECISION OF THE ENZYWELL TOXOPLASMA IgM KIT

In-run Precision:

<i>Sample</i>	<i>TXM 1</i> <i>(Negative <Cut Off)</i>	<i>TXM 2</i> <i>(Positive >Cut Off)</i>	<i>TXM 3</i> <i>(Positive)</i>	<i>Cut Off</i>	<i>Positive Control</i>
<i>n (replicates)</i>	24	24	24	12	12
<i>O.D.</i>	0.21	0.56	1.42	0.28	0.95
<i>CV%</i>	6	6	5	12	7

Inter-assay Precision:

	<i>Index</i>	
	<i>Average</i>	<i>CV%</i>
<i>Pos.Control</i>	3,8	8
<i>TXM1</i>	0,6	15
<i>TXM2</i>	1,7	10
<i>TXM3</i>	4,4	10

Precision between lots:

<i>Sample</i>	<i>Index</i>			<i>Media</i>	<i>CV%</i>
	<i>Lot n. 159</i>	<i>Lot n. 160</i>	<i>Lot n. 161</i>		
<i>TXM1</i>	0,4	0,5	0,5	0,5	12
<i>TXM2</i>	1,8	1,5	1,2	1,5	20
<i>TXM3</i>	3,0	3,8	3,6	3,5	12

16. TROUBLE SHOOTING GUIDE

PROBLEM	POSSIBLE SOURCE	TEST OR ACTION
Invalid run (all negative)	One or more reagents not added or added in wrong sequence	Recheck procedure Check for unused solutions. Repeat test.
	Unreactive plate	Check the code on the package containing the plate (see package insert for correct code).
		Check for moisture in unused plate. (Silica gel dessiccant must be pale yellow).Repeat test
Invalid run (all positive)	Contamination of substrate	Take new aliquot of substrate.
	Inadequate washing	Ensure that wash apparatus works well
Poor precision	Incomplete washing of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Inadequate aspiration of wells	Ensure that wash apparatus works well
	Pipetting error	Check pipette function
	Reagent addition too slow	Avoid drying of the plate after washing step. Add reagents immediately
	Presence of bubbles	Avoid air bubbles during pipetting.
	Optical pathway not clean	Check instrument light source and detector for dirt. Wipe bottom of plate with soft tissue.
Inadequate Color development	Incorrect incubation times or temperature	Check for temperature control and time monitoring
		Adhere to recommended instruction for use.
	Inadequate volume of substrate added to the plate	Check pipette function.

17. REFERENCES

1. G.B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. P. Herbrink, A. van Loon et al.: Interlaboratory evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay, antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 25: 100 (1987).
3. F. Wielaard, H. van Gruijthuisen et al.: Diagnosis of acute toxoplasmosis by an enzyme immunoassay for specific immunoglobulin M antibodies. J. Clin. Microbiol. 17: 981 (1983).
4. J. Fung, A. Clogston et al.: Serologic diagnosis of toxoplasmosis with emphasis on the detection of toxoplasma-specific immunoglobulin M antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 83: 196 (1985).
5. Remington J.S., Miller M.J., Brownlee I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. Pediatrics 41: 1082 (1968).



DIESSE Diagnostica Senese
Via delle Rose 10
53035 Monteriggioni (Siena) Italy
Tel. 0577-587111