

Imuno-CON TOXO

Kit para determinação qualitativa e semi-quantitativa de anticorpos anti-Toxoplasma gondii no soro humano por imunofluorescência indireta.

An indirect immunofluorescence kit for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies anti-Toxoplasma gondii in human serum.

Kit para la determinación cuantitativa semi cuantitativa de anti Toxoplasma Gondii en el suero humano por inmunofluorescencia.

Kit para la determinación cuantitativa semi cuantitativa de anti Toxoplasma Gondii en el suero humano por inmunofluorescencia.

[REF 1660-I *determinações / determinations / determinaciones*

[REF 16100-I *determinações / determinations / determinaciones*

[REF 1660-I *determinações / determinations / determinaciones*

	WAMA Diagnóstica
	Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT CEP 13560-971 - São Carlos - SP - Brasil Fone 55 16 3377.9977 / Fax 55 16 3377.9970 www.wamadiagnostica.com.br

PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A toxoplasmose é uma infecção causada por um protozoário, o *Toxoplasma gondii*. Como ele pode parasitar todas as células nucleadas, as manifestações clínicas podem ser muito variáveis, tais como: coriorretinites, miocardites, pericardites, pneumonias, miosites, meningoencefalites, hepatites, ocorrendo isoladamente ou combinadas, certas vezes difusas, vistas em pacientes portadores de imunodeficiências ou recebendo terapêutica imunossupressora. O problema mais sério que resulta da infecção por *T. gondii* é a transmissão congênita do parasita ao feto durante a gravidez. O comprometimento fetal severo pode acarretar a morte do feto, a morte do recém-nascido ou enfermidade congênita, expressa por uma tríade de sintomas: hidrocefalia ou microcefalia, coriorretinite e calcificações cerebrais. A transmissão congênita transplacentária da toxoplasmose depende basicamente da existência de infecção aguda na etapa gestacional. Quanto menor a idade gestacional, maior o risco de comprometimento fetal, sendo que o comprometimento mais grave ocorre no primeiro trimestre da gestação.

Geralmente o início da infecção pelo *T. gondii* é insidioso, caracterizando-se por febre, adinamia e adenopatia, principalmente cervical, entretanto, frequentemente ocorre na forma subclínica, com sintomas leves e inespecíficos.

O diagnóstico da toxoplasmose jamais poderá ser estabelecido com base em dados puramente clínicos. Há sempre necessidade da confirmação laboratorial e correta interpretação dos resultados.

Os métodos laboratoriais mais importantes para o diagnóstico da toxoplasmose são: a imunofluorescência indireta, a hemaglutinação passiva e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Os anticorpos anti-toxoplasma presentes no soro se ligam ao antígeno fixado na lâmina e são revelados por uma antigamaglobulina marcada com isotiocianato de fluoresceína.

APRESENTAÇÃO DO KIT

[REF 1660-I (60 determinações)

- Lâminas com 06 áreas reativas de suspensão de *Toxoplasma gondii* (10 lâminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (1x4 ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20x concentrado (2 x 50 ml).
- Glicerina tamponada (4 ml)

- Azul de Evans (2 ml)
- Soro controle humano positivo (1 ml)
- Soro controle humano negativo (1 ml)
- Laminulas (10 unidades)
- Instruções para uso

[REF 16100-I (100 determinações)

- Lâminas com 10 áreas reativas de suspensão de *Toxoplasma gondii* (10 lâminas)
- Antigamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (1x5 ml)
- Tampão fosfato-salino (PBS) 20 x concentrado (3 x 50 ml).
- Glicerina tamponada (4 ml)
- Azul de Evans (2 ml)
- Soro controle humano positivo (1 ml)
- Soro controle humano negativo (1 ml)
- Laminulas (10 unidades)
- Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• **LÂMINAS COM SUSPENSÃO DE TOXOPLASMA GONDII (1):** deixá-las à temperatura ambiente por 15 minutos, antes de retirá-las do envelope. Estáveis em geladeira (2-8°C) até a data do vencimento.

• **ANTIGAMAGLOBULINA HUMANA (IgG) MARCADA (2):** pronta para uso. Estável em geladeira (2 - 8°C) até a data do vencimento. Proteger da luz. Contém azida sódica 0,1%.

• **TAMPÃO FOSFATO SALINO (PBS) (3):** Diluir o PBS concentrado 1/20 (Ex.: 10 ml de PBS + 190 ml de água destilada ou deionizada). Conservar em geladeira em recipiente limpo e bem vedado. Desprezar a solução se ocorrer mudança do pH ou turvação. Estável até a data do vencimento. Obs.: Caso ocorra cristalização do PBS antes da diluição, colocar em banho maria 37°C até a completa dissolução dos cristais.

• **GLICERINA TAMPONADA (4):** Pronta para uso. Estável em geladeira (2- 8°C) até a data do vencimento.

• **AZUL DE EVANS (5):** Pronto para uso. Estável em geladeira (2 - 8°C) até a data do vencimento.

• **SORO CONTROLE POSITIVO (6):** Pronto para uso. Estável até a data do vencimento. Contém, azida sódica 0,1%.

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (7):** Pronto para uso. Estável até a data do vencimento. Contém azida sódica 0,1%.

O kit mantém o mesmo desempenho após a primeira utilização e é estável até a data de validade descrita no rótulo, desde que seja mantido na temperatura indicada (2-8°C).

AMOSTRAS

Soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Microscópio de fluorescência
- Tubos de ensaio
- Pipetas sorológicas
- Jarra de Coplin ou similar
- Água destilada ou deionizada
- Frasco para 1 litro
- Câmara de incubação
- Papel absorvente

PROCEDIMENTO

TESTE QUALITATIVO

Objetivo: para a triagem dos soros e eliminação dos não reagentes.

- Diluir o soro desconhecido 1/32. Sugere-se 0,31ml de tampão fosfato-salino (PBS) com 10 Ida amostra.
- Usar os soros controles não diluídos.
- Continuar o protocolo a partir da etapa 2 do teste semi-quantitativo.

TESTE SEMI-QUANTITATIVO

Objetivo: os soros positivos no teste qualitativo são titulados para determinação da fase da doença.

- Diluir as amostras positivas com PBS, a partir da diluição 1/32, obedecendo à razão 2.
- Exemplo.: 1/32, 1/64, 1/128, 1/256..., 1/4000 ou mais.
- Deixar a(s) lâmina(s) equilibrar(em) a temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirá-la(s) do envelope. Removê-la(s) sem tocar no substrato.

- Pingar 1 gota dos controles positivo (6) e negativo (7), **sem diluir**, nas áreas 1 e 2, respectivamente. Evitar transbordar as áreas.
- Pingar 1 gota dos soros desconhecidos diluição 1/32 no teste qualitativo e titulado no teste semi-quantitativo nas áreas restantes da(s) lâminas(s), evitando transbordar.
- Incubar em câmara úmida por 30 minutos, à temperatura ambiente.
- Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com tampão fosfato-salino (PBS) (3), aproximadamente 10 ml. Usando uma pisseta dirigir o PBS pela borda longitudinal da lâmina, tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lavá-la(s) 3 vezes com PBS 5 minutos cada vez, agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem.
- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de

PBS sacudindo-a(s) sobre o papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para etapa 8 para não secar o local da reação.

- Retornar à câmara úmida. Pingar 1 gota de antigamaglobulina marcada em cada área da(s) lâmina(s), tendo cuidado de recobri-la(s) totalmente.
- Incubar em câmara úmida por 30 minutos, a temperatura ambiente, protegendo do excesso de luz.
- Remover a(s) lâmina(s) da câmara úmida. Segurá-la(s) por uma extremidade e lavá-la(s) com PBS (3), aproximadamente 10 ml. Usando uma pisseta dirigir o PBS (3) pela borda longitudinal da(s) lâmina(s), tendo o cuidado de não atingir diretamente as áreas reativas, evitando, com isso, prejudicar o substrato. Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin ou similar e lava-la(s) 3 vezes com PBS, 5 minutos cada vez agitando suavemente o Coplin algumas vezes durante cada lavagem. Pingar 2 à 3 gotas de AZUL DE EVANS (5) no Coplin desta última lavagem.
- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin, uma de cada vez. Tirar o excesso de PBS sacudindo-a(s) sobre o papel absorvente. Secar em torno das áreas reativas e ir **IMEDIATAMENTE** para a etapa 12 para não secar o local da reação.
- Pingar 3 a 4 gotas de glicerina tamponada (4) entre as áreas reativas. Cobrir a(s) lâmina(s) com laminula(s) evitando a formação de bolhas. Secar o excesso de glicerina com papel absorvente, Limpar o dorso da lâmina.
- Ler em microscópio de fluorescência. É conveniente fazer leitura no mesmo dia. Entretanto, no caso de não ser possível, conservá-la(s) em geladeira (2-8°C) protegida(s) da luz e lê-la(s) no dia seguinte. . A glicerina não deve secar, se isto ocorrer colocar mais glicerina.

RESULTADO DAS LEITURAS

Reação Negativa: AUSÊNCIA de fluorescência amarelo-esverdeada em todo o contorno do toxoplasma. Os parasitas exibem uma coloração avermelhada.

Reação Positiva: PRESENÇA de fluorescência amarelo-esverdeada característica em todo o contorno do toxoplasma (anticorpo "anti-parede").
OBSERVAÇÃO: examinar sempre os controles positivo e negativo para controle da reação.
INTERPRETAÇÃO

A interpretação dos resultados de imunofluorescência indireta na caracterização de ausência de infecção atual ou progressa deve ser baseada na presença ou ausência de anticorpos IgG e IgM anti-toxoplasma. Os soros que dão reação negativa para IgG e IgM anti-toxoplasma são informados como **NÃO REAGENTES** e significam ausência de infecção atual ou progressa para toxoplasmose.

Os soros que dão reação positiva para IgG (geralmente títulos altos) e IgM anti-toxoplasma são informados como REAGENTES, com seus respectivos títulos (Ex.: IgG=REAGENTE ATÉ 1/8000 e IgM=REAGENTE ATÉ 1/256) e significam infecção recente por toxoplasma. Os soros que mostram reação positiva para IgG e negativa para IgM anti-toxoplasma significam infecção progressa.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Reagentes somente para uso diagnóstico in vitro.
- O kit deverá ser conservado em geladeira entre 2-8°C.
- A conservação das lâminas pode ser feita selando as bordas da laminula com esmalte de unha e guardando-as no escuro entre 2-8°C por, no máximo, 2 meses.
- Como se emprega azida sódica a 0,1% como conservante, o descarte dos reagentes deve ser acompanhado de grandes volumes de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, pois esta pode reagir com chumbo ou cobre formando sais altamente explosivos. Além disso, a azida é tóxica quando ingerida.
- Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpos anti-HIV, anti-HCV e antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar os soros controles como materiais potencialmente infecciosos.
- Não substituir componentes deste kit com o de outros fabricantes, nem usar componentes de lotes e códigos diferentes.
- Não usar fora do prazo de validade.
- Descarte o material conforme regulamentações locais.
- Realizar manutenção periódica do microscópio, pois a extrapolação da vida útil da lâmpada poderá prejudicar a análise dos resultados.
- Seguir as boas práticas laboratoriais (BPLs) na conservação, manuseio e descarte dos materiais.

TERMO DE GARANTIA

A WAMA Diagnóstica garante a troca deste conjunto diagnóstico, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e que seja comprovado por sua assessoria técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A WAMA e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho do kit sob essas condições.

ENGLISH

SUMMARY
Toxoplasmosis is caused by a protozoan called *Toxoplasma gondii*. As this protozoan can parasite all cells with nucleus, the infections can vary such as: coriorretinitis, myocarditis, pericarditis, pneumonia, myositis,

meningoencephalitis, hepatitis. These infections are isolated or combined, often diffuse, they can be seen in patients with immunodeficiency or undergoing immunosuppressive therapy.

Toxoplasmosis has emerged as a serious complication in congenitally infected children causing the death of fetus and infant or congenital disease. The symptoms such as hydrocephalus or microcephalus, coriorretinitis and cerebral calcifications are present. The transplacental congenital transmission of toxoplasmosis depends on an acute infection during pregnancy

When the pregnancy is acquired during the first trimester of the gestational fetal, death or major abnormalities may occur.

T. gondii infection is insidious and characterized by fever, adynamia and adenopathy, mainly cervical. However, it is present on subclinical form presenting non-specific and light symptoms.

Toxoplasmosis diagnosis should not be made solely on the findings of one clinical assay. When making any diagnosis, it is strongly recommended to take all clinical results into consideration.

The most reliable and effective laboratorial methods for toxoplasmosis are: Indirect. Immunofluorescence, passive hemagglutination and ELISA.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-toxoplasmosis antibodies present in the serum bind to an antigen-fixed slide and are revealed by an antigammaglobuin labelled with FITC.

KIT PRESENTATION

[REF 1660-I (60 determinations)

- 6-well *Toxoplasma gondii* Slides (10 slides)
- Antigammaglobulin G human labelled with FITC (1x4ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x concentrated (2x50ml).
- Mounting Medium (4 ml)
- Evans Blue (2 ml)
- Human positive control serum (1 ml)
- Human negative control serum (1 ml)
- Coverslips (10 units)
- Instructions for use

[REF 16100-I (100 determinations)

- 10-well *Toxoplasma gondii* Slides (10 slides)
- Antigammaglobulin G human labelled with FITC (1x5ml)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x concentrated (3x50ml).
- Mounting Medium (4 ml)
- Evans Blue (2 ml)
- Human positive control serum (1 ml)
- Human negative control serum (1 ml)
- Coverslips (10 unidades)
- Instructions for use

REAGENT STABILITY AND STORAGE

• **SLIDES (1):** Let the pouch equilibrate to room temperature for 15 minutes then remove the slide from the pouch. Stable if stored in refrigerator at 2°C to 8°C up to expiration date.

• **CONJUGATE (2):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. Protect from light. It contains Sodium Azide 0.1%.

• **PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS) (3):** Dilute PBS at 1:20 (Ex: 10ml of PBS + 190ml of distilled or deionized water). Stable up to expiration date if stored at 2-8°C in a clean and sealed container. Discard if turbidity or changing on pH is present.

Obs.: In case of PBS crystallization is present before dilution, keep it in water bath at 37°C up to a complete crystal dissolution.

• **MOUNTING MEDIUM (4):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **EVANS BLUE(5):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date.

• **POSITIVE CONTROL SERUM (6):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. It contains Sodium azide 0.1%.

• **NEGATIVE CONTROL SERUM (7):** Ready for use. Stable if stored at 2-8°C up to expiration date. It contains Sodium azide 0.1%.

The kit presents good performance after begin used for the first time. It is stable up to the expiration date if store at 2-8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly haemolysed, lipaemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used. Store serum at 2-8°C up to 72 hours. For longer storage, the serum should be stored in freezer at -20°C. Avoid repeated thawing and freezing of specimens.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Fluorescence microscope
- Micropipette
- Test tube
- Serological pipettes
- Coplin jar or similar
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Incubation chamber
- Paper towel

PROCEDURE

QUALITATIVE TEST

Objective: It's intended to screening and removal of negative serum.

- Dilute an unknown serum at 1:32. Suggestion: 0.31ml of PBS with 10µl of specimen.

- Use undiluted control serum.
- Follow the protocol from step 2 of semi-quantitative test.

SEMI-QUANTITATIVE TEST

Objective: Positive serum in the qualitative test are titrated in order to determine the stage of the disease.

- Dilute positive specimens with PBS, starting from a dilution at 1:32, following the ratio 2.

Ex: 1:32, 1:64, 1:128, 1:256..., 1:4000 and so on.

- Allow the pouch to equilibrate room temperature for 15 minutes, then remove the slide from the pouch. Remove carefully the slide without touching on the substrate.

- Add 1 drop of positive control (6) and negative (7), undiluted, in the wells 1 and 2 respectively. Avoid overfilling the wells.

- Add 1 drop of unknown serum diluted at 1:32 in the qualitative test and 1 drop of titrated serum in the semi-quantitative test in the remaining wells. Avoid overfilling the wells.

- Incubate the slide for 30 minutes at room temperature.

- Remove the slides from the incubation chamber. Hold the slide at tab end and rinse it with 10ml (PBS) (3). With a pipette, lead PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch reagent wells to avoid damaging the substrate. Transfer the slide into the Coplin jar or similar and rinse it three times with PBS for 5 minutes each time. Gently shake the jar during rinsing.

- Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of slide on a paper towel to remove PBS. Dry around reactive wells. To prevent the slide from drying, go IMMEDIATELY to step 8.

- Place the slide back to incubation chamber. Apply 1 drop of the conjugate in each well. Be sure to fill the well completely.

- Incubate the slide for 30 minutes at room temperature. Protect it from light.

- Remove the slide from incubation chamber. Hold the slide at tab end and rinse it with 10 ml of PBS(3). With a pipette, lead PBS by the longitudinal edge of the slide. Be sure not to touch reagent wells to avoid damaging the substrate. Transfer the slide into Coplin jar or similar and rinse it three times with PBS for 5 minutes each time. Gently shake the jar. Add 2 to 3 drops of Evans Blue (5) in the Coplin in the last rinsing.

- Remove the slide from Coplin jar, one by one. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove PBS excess. Dry around reactive wells. To prevent wells from drying, go IMMEDIATELY to step 12

- Apply 3 to 4 drops of Mounting Medium (4) in the reactive wells. Cover the slides with coverslips avoiding air bubbles. Dry the excess of Mounting Medium with a paper towel. Clean the slide reverse.

- The slide must be read under a fluorescence microscope as soon as possible. If it is not possible, store the slide at 2-8°C, protect it from light and interpret in the following day. Mounting Medium should not dry, if necessary, add more.

READING

Negative: ABSENCE of yellow-greenish fluorescence on all toxoplasma outline. Parasites are seen by a redish color.

Positive: PRESENCE of a typical yellow-greenish fluorescence on all toxoplasma outline (antibody "anti-wall").

OBSERVATION: Always check positive and negative controls for reaction control purposes.

INTERPRETATION

The interpretation of indirect immunofluorescence results to evaluate the absence of a current or past infection should be based on the presence or absence of anti-toxoplasma antibodies IgG and IgM.

Serum negative for IgG and IgM anti-toxoplasma are regarded as NEGATIVE and mean the absence of current or past toxoplasmosis infection.

Serum positive for IgG (mostly high titers) and IgM anti-toxoplasma are regarded as POSITIVE (Ex: IgG = POSITIVE up to 1:8000 and IgM = POSITIVE up to up to 1:256) and mean recent toxoplasma infection.

Serum positive for IgG and negative for IgM anti-toxoplasma mean past infection.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

- For in vitro Diagnostic use only.
- The kit should be stored at 2-8°C.
- The conservation of the slide is done by sealing the coverslip edge with nail varnish and storing at 2-8°C in a dark room for 2 months.

- Sodium Azide 0.1% is used and it can react with lead and cooper plumbing forming highly explosive metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide is toxic if ingested.

- All human components have been tested for HBsAg, anti-HIV, anti-HCV and found to be negative. However, this does not assure the absence of these and other infectious diseases. All human components should be handled as potentially hazardous.

- Do not interchange kit components with those from sources other than the same code number from WAMADIAGNOSTICA.

- Do not use components beyond their expiration date.

- Disposal in accordance with local regulations.

- The periodical maintenance of the microscope is recommended since an expired lamp can interfere in the result analysis.

- Follow good laboratory practices (GLP) related to storage, dispensing and material disposal.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La toxoplasmosis es una infección causada por un protozoario, el *Toxoplasma gondii*. Como el puede parasitar todas las células enucleadas, las manifestaciones clínicas pueden ser multe variable, tales como: coriorretinitis, miocarditis, pericarditis, neumonías, miositis, meningoencefalitis, hepatitis, ocurriendo aisladamente combinadas, ciertas veces difusas, vistas en pacientes portadores de inmunodeficiencias o recibiendo terapéutica inmunopresora. El problema mas serio resultante de la infección por *T.gondii* es la transmisión congénita del parásita al feto durante el embarazo El comprometimiento fetal severo puede acarrear la muerte del feto, la muerte del recién-nacido o la enfermedad congénita, expresa por una triade de síntomas: hidrocefalia o microcefalia, corrió retinitis y calcificación celebrales. La transmisión congénita transplacentaria de la toxoplasmosis depende básicamente de la existencia de una infección aguda en la etapa de gestación. Cuanto menor la edad de gestación, mayor el riesgo de comprometimiento fetal, sendo que el comprometimiento mas grave ocurre en el primero trimestre de la gestación .

Generalmente el inicio de la infección por el *T. gondii* es insidioso, caracterizando-se por fiebre, adinamia, adenopatía, principalmente cervical, pero, frecuentemente ocurre en la forma subclínica, con síntomas livianos y inespecíficos.

El diagnóstico de la toxoplasmosis jamás podrá ser establecido con base en datos puramente clínicos. Hay siénten necesidad de la confirmación de laboratorio y correcta interpretación de los resultados. Los métodos de laboratorio mas importantes para el diagnóstico de la toxoplasmosis son: la inmunofluorescencia indirecta, a hemaglutinación pasiva y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

PRINCIPIO DO MÉTODO

Los anticuerpos anti toxoplasma presentes el suero se ligan al antígeno fijado en la lamina y son revelados por una antigamaglobulina marcada con isotiocianato de fluoresceína.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 1650-I (50 determinaciones)

- Laminas con 10 áreas reactivas de suspension de toxplasma Gondii (5 laminas)

- Antigamaglobulina G humana marca con isotiocianato de inmunofluorescencia (1x5)

- Tapón fosfato salino (PBS) 20x concentrado (20x50 ml)

- Glicerina taponada (4 ml)

- Azul de Evans (2ml)

- Suero control humano positivo (1 ml)

- Suero control humano negativo (1ml)

- Laminuelas (5 unidades)

- Instrucciones para el uso

REF 16100-I (100 determinaciones)

- Laminas con 10 áreas reactivas de suspension de *toxplasma Gondii* (10 laminas)

- Antigamaglobulina G humana marca con isotiocianato de inmunofluorescencia (1x5)

- Tapón fosfato salino (PBS) 20x concentrado (20x50 ml)

- Glicerina taponada (4 ml)

- Azul de Evans (2ml)

- Suero control humano positivo (1 ml)

- Suero control humano negativo (1ml)

- Laminuelas (10 unidades)

- Instrucciones para el uso

REPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Laminas con suspension del toxoplasma (1): Dejar en temperatura ambiente por 15 minutos antes de retiraras del sobre. Estable en congelador (-20°C) hasta la fecha de caducidad.

Antigamaglobulina humana(IgG) marcada(2): Lista para el uso Estable en nevera (2 a 8°C) hasta la fecha de caducidad proteger de la luz contiene azida sodica 0,1%.

Tapón de fosfato (PBS) (3): Diluir el PBS concentrado 1/20 (Ejemplo: 10 ml de PBS 190 ml de agua destilada o deionizada. Conservar en nevera en recipiente limpio y bien vedado. Despresar la solución si ocurrir cambios del pH o turbación. Estable hasta la fecha de caducidad.

Obs: Caso ocurra cristalización del PBS antes de la dilución colocar en remojo a 37°C hasta la completa disolución de los cristales.

Glicerina Taponada (4):Lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

Azul de Evans(5): Lista para el uso. Estable en nevera (2-8°C) hasta la fecha de caducidad.

Suero control positivo (6): Lista para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad.

Suero control Negativo (7): Lista para el uso. Estable hasta la fecha de caducidad.

El kit mantiene el mismo desempeño del primer uso, y es estable hasta la fecha de caducidad desde que sea mantenido em ea temperatura de 2-8°C.

MUESTRAS

Suero libre de hemolise lipemia o contaminación. Los sueros pueden ser

conservados en nevera (2-8°C) hasta 72 horas, para un tiempo mayor debe ser guardada en congelador hasta -20°C

MATERIALES NECESARIOS PERO NO FORNECIDOS

-Microscopio de fluorescencia

-micro pipeta

-Tubos de ensayo

-Pipetas suero lógicas

-Jarra de Coplin o similar

-Agua destilada o deionizada

-Frasco para un litro

-Cámara de Incubación

-Papel absorbente

PROCEDIMIENTO

Teste cuantitativo

Objetivo: para la selección de sueros y eliminación de los no reactivos.

- Disminuir el suero desconocido 1/32. Sugiere se 0,31 ml de tapón fosfato salino (PBS) con 10ul de la muestra

- Usar los sueros controles no diluidos

- Continuar el protocolo a partir de la etapa 2 semi cuantitativo.

Teste Semi Cuantitativo

Objetivo: los sueros positivos en los testes cuantitativos son titulados para la determinación de la fase de la enfermedad.

- Diluir las muestras positivas con PBS a partir de la dilución 1/32 obedeciendo la razon 2. Ejemplo 1/32 1/64 1/28 1/256...1/4000 o mas

- dejar las laminas equilibrar las en temperatura ambiente por 15 minutos antes de retirar las del sobre. Removerlas sin tocar en el substrato.

- Pingar 1 gota de los control de los controles positivos (6) y negativo(7) sin diluir en las áreas 1 y 2 respectivamente. Evitar transbordar el área

- Pingar 1 gota de los sueros desconocido dilucion 1/32 en el teste cuantitativo y titulado en el teste semi cuantitativo en áreas restantes de las laminas evitando transbordar

- incubar la cámara húmeda por 30 minutos la temperatura ambiente.

- remover las laminas de la cámara húmeda. Aguantaras por una extremidad y lévalas con tapón fosfato salino (PBS) (3) aproximadamente 10 ml. Usando una pipeta dirigir el PBS por la borda longitudinal de la lamina teniendo cuidado de no atngir directamente áreas reactivas evitando con eso perjudicar el substrato Colocar las laminas en una jarra de coplin o similar y lavar 3 veces con el PBS 5 minutos cada vez agitando subvente el coplin algunas veces durante cada aclaración.

- Remover las laminas del Coplin una de cada vez Retirar el exceso de PBS sacudiendo las sobre el papel absorberte Secar en torno del área reactiva y pasar inmediatamente para la etapa 8 para no secar el local de la reacción.

- Retornar a la cámara húmeda Pingar una gota de antigamaglubulina en cada área de las laminas teniendo cuidado para no descubrirla totalmente.

- Remover las laminas de la cámara húmeda por 30 minutos a la temperatura ambiente protegiendo del exceso de luz

- Remover las laminas de camera húmeda. Aguantaras por una extremidad y lévalas con tapón fosfato salino (PBS) (3) aproximadamente 10 ml. Usando una pipeta dirigir el PBS por la borda longitudinal de la lamina teniendo cuidado de no atngir directamente las áreas reactivas evitando con eso perjudicar el substrato Colocar las laminas en una jarra de coplin o similar y aclarar veces con el PBS 5 minutos cada vez agitando subvente el coplin algunas veces durante cada aclaración. Pingar 2 a 3 gotas de azul de Evans (5) en el Coplin de esta ultima aclaración

- Remover las laminas del coplin una de cada vez Sacar el exceso de PBS sacudiendo sobre el papel absorbente. Secar en torno de las áreas reactivas y pasar inmediatamente para la etapa 12 para no secar el local de la reacción.

- Pingar 3 a 4 gotas de glicerina taponada (4) entre el área reactiva Cubrir las laminas con laminuelas evitando formación de burbujas Secar el exceso de glicerina con el papel absorbente Limpiar el dorso de la lamina

- Leer el microscopio de fluorescencia Conviene hacer lectura en el mismo día Pero en el caso de no ser posible conservar en nevera (2-8°C) protegidas de la luz y leerlas en el día siguiente. La glicerina no debe secar si esto ocurrir colocar mas glicerina.

RESULTADO DE LAS LECTURAS

Reacción Negativa: AUSENCIA de fluorescencia amarillo verdoso en todo el contorno del toxoplasma. Los parásitas exhiben una coloración

Reacción Positiva: PRESENCIA de fluorescencia amarillo verdoso característica en todo el contorno del toxoplasma (anticuerpo anti "pared")

Observación: examinar siempre los controles positivos y negativos para el control de la reacción.

INTERPRETACIÓN

La interpretación de los resultados de inmunofluorescencia indirecta de la caracterización de la ausencia de infección actual o pregressa debe ser basada en la presencia o ausencia de anticuerpos IgGy IgM antitoxoplasma

Los sueros que dan reacción negativa para IgG IgM anti toxoplasma son informados como no reactivos y significan ausencia de infección actual o pregressa para la toxoplasmosis.

Los sueros que dan reacción negativa para IgG (generalmente titulados altos) y IgM antitoxoplasma son informados como reactivos con sus respectivos títulos (Ejemplo: IgG = reactivos hasta 1/8000 y IgM = Reactivo hasta 1/256) y significan infecciones reciente por el toxoplasma.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Reactivos solamente para uso de diagnostico in vitro

- Las laminas deben ser conservadas en congelador a -20°C evitando el congelamiento y descongelamiento el restante del kit deberá ser conservado en nevera entre 2-8°C

- La conservación de la lamina puede ser hecha sellando las bordas de laminuelas con esmalte de uñas y guardando las en el oscuro ente 2-8°C por en el máximo 2 meses.

- Como se emplea azida a 0,1% como conservante el descarte de los reactivos deben ser acompañados de grandes volúmenes de agua para evitar el acumulo de azida en las tuberías pues esa puede reaccionar con el plomo y cobre formando sales altamente explosivos Además la azida sodica es toxica cuando ingerida.

- Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueron testados con resultados negativos para el anticuerpo anti VIH anti HCV y anfigenos de superficie de hepatitis B (HBsAg) pero como ningún método diagnostico ofrece completa seguridad de la ausencia de estés y otros agentes infecciosos recomienda se tratar los sueros controles como materiales potencialmente infecciosos.

- No sustituir componentes de esos kit con los de otros fabricantes ni usar componentes de lotes y códigos distintos

- No usar fuera de la fecha de caducidad

- Descarte de lo material de acuerdo con las regulaciones locales.

- Realizar un mantenimiento regular del microscopio, ya que la extrapolación de la vida de la lámpara podrían afectar el análisis de los resultados.

- Seguir las buenas practicas de laboratorio (BPL) en la conservación manoseo y descarte e los materiales

TÉRMINOS DE GARANTÍA

La WAMA Diagnostica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si desde el momento que el mismo esté dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoría técnica de que no hubieron fallos en la ejecución, manoseo y conservación de este producto. La WAMA y sus distribuidores no se responsabilizan por los fallos en el desempeño del kit bajo sobre estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA

- Boyer, K.M. and McAuley, J.B.: Congenital Toxoplasmosis. **Semin. Pediatr. Infect.Dis.**, 5:42-51, 1994.

- Camargo M.E.: Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Rev.Inst. Med. Trp. S. Paulo**, 6(3): 117-118, 1964.

- Camargo, M.E.; Leser, P.G.; Rocca, A.: Detection of IgM anti-toxoplasma antibodies in acute and congenital toxoplasmosis after protein A treatment of serum. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 25(5): 201-206, 1983

- Cohen, S.; Sadun, E.H.: Serodiagnosis of toxoplasmosis. **Immunology of Parasitic Infections**. Blackwll Scientific Publications, Oxford, London, 1978.

- Guertin, N.G. et al.: Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. **N. Engl. J.Med.**, 330, 1858-1863, 1994.

- Hezard, N. et al.: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in 261 pregnancies. **Prenatal Diagn.**, 17: 1047-1054, 1997

- Hollimann, R., E.: Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. **Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.**, 6: 5-16, 1994

- Nussenblatt, R.B. and Belfort, R.: Ocular toxoplasmosis and old disease revisited. **JAMA**, 271: 304-307, 1994

- Wilson, M. and McAuley, J.B.: Toxoplasma. In: Murray, P.R., Baron, E.J.: Pfaller, M.ª: Tenover, F.C. and Tenkoff, R.H. (editors). **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., ASM Press, Washington, D.C.: 1374-1382, 1999

- Wong, S.Y. and Remington, J.S.: Toxoplasmosis in pregnancy. **Clin.Infect Dis.**, 18: 853-862, 1994.

SIMBOLOGIA / SIMBOLS / SIMBOLOGIA



O conteúdo é suficiente para (n) testes
Quantity sufficient for (n) tests
O contenido es suficiente para (n) testes



Número do lote
Lot Number
Número del lote



Data limite de utilização
Expiry Date
Fecha de la caducidad



Número do catálogo
Catalog Number
Número del catálogo



Produto diagnóstico *in vitro*
In vitro diagnostic
Producto diagnóstico *in vitro*



Limite de temperatura
Temperature
Limite de temperatura



Consultar instruções para uso
Refer to user's instructions
Consultar las instrucciones para el uso



Proteger do calor
Keep away from sunlight
Proteger del calor



Representante Europeu
European Representative
Representante Europeu



Fabricado por
Manufactured by
Fabricado por