

Imuno-HAI TOXOPLASMOSE

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

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

Kit para la determinación cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en el suero humano por hematoaglutinación indirecta.

REF 36096-H: 96 determinações / determinations / determinaciones

REF 36192-H: 192 determinações / determinations / determinaciones

REF 36380-H: 380 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

Obelis S.A.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Phone: +(32) 2 732-59 54
Fax: +(32) 2 732-60 03
www.obelis.net




PORTUGUÊS

IMPORTÂNCIA CLÍNICA

O 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 resultante 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 a 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

Eitricócitos de aves estabilizados, sensibilizados com componentes antigênicos do *Toxoplasma gondii* altamente purificados, mostram aglutinação quando reagem com anticorpos contra esses antígenos presentes no soro.

APRESENTAÇÃO DO KIT

- REF 36096-H (96 determinações qualitativas)
- Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Toxoplasma gondii* (2,4ml)
 - Solução diluente (1x 40ml)
 - 2-Mercaptoetanol (1 x 0,5ml)
 - Soro controle positivo (1 x 1ml)
 - Soro controle negativo (1 x 1ml)
 - Placas de microtitulação descartáveis com fundo em “V” (1x96 cavidades)
 - Instruções para uso

REF 36192-H (192 determinações qualitativas)

- Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Toxoplasma gondii* (1 x 4,8ml)
- Solução diluente (1x60ml)
- 2-Mercaptoetanol (1 x 0,5ml)
- Soro controle positivo (1 x 1ml)
- Soro controle negativo (1 x 1ml)
- Placas de microtitulação descartáveis com fundo em “V” (2x96 cavidades)
- Instruções para uso

REF 36380-H (380 determinações qualitativas)

- Suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes do *Toxoplasma gondii* (2x4,8ml)
- Solução diluente (2x60ml)
- 2-Mercaptoetanol (1 x 1ml)
- Soro controle positivo (1 x 1ml)
- Soro controle negativo (1 x 1ml)
- Placas de microtitulação descartáveis com fundo em “V” (4x96 cavidades)
- Instruções para uso

PREPARAÇÃO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

• SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS (1):

Pronto para uso.

Conservar entre 2-8 °C. Não Congelar.

Homogeneizar bem as hemácias antes de uso, sempre com movimentos circulares do frasco entre as mãos e por inversão do frasco; nunca por agitação, pois esta pode acarretar hemólise e/ou autoaglutinação .

• SOLUÇÃO DILUENTE (2):

pronta para uso. Conservar entre 2-30°C.

• **2-MERCAPTOETANOL (3):** Conservar ao abrigo da luz. Deverá ser diluído com a solução diluente (2), na proporção 10ml da solução diluente para 70µl de 2-ME (3). Esta solução diluente com 2-Mercaptoetanol é usada para diluir a amostra de soro para a determinação de infecção recente (IgM) ou presença de anticorpos inespecíficos. Esta solução poderá ser diluída em frasco ambar e acondicionada em geladeira (2-8°C), juntamente com o kit. Assim utilizando-a conforme a necessidade. Após o preparo a solução diluente com 2-ME é estável por 30 dias.

• **SORO CONTROLE POSITIVO (4):** pronto para uso. Conservar entre 2 -8°C.

• **SORO CONTROLE NEGATIVO (5):** pronto para uso. Conservar entre 2-8°C.

Obs. 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

Usar soros frescos ou conservados a -20°C (máximo de 4 a 6 semanas) de pacientes em jejum. As amostras devem estar a temperatura ambiente antes do uso e não necessitam de qualquer tratamento previo. Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico. Evitar o congelamento e descongelamento repetidos das amostras. Os soros envelhecidos tendem a se gelificar ao contato com o 2-Mercaptoetanol.

MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Tubos de ensaio
- Pipetas sorológicas
- Estante de tubos e rack
- Recipiente para descarte de material

PROCEDIMENTO

a. TESTE QUALITATIVO (“Screening”)

Objetivo: para triagem e eliminação dos soros não reagentes.

- Colocar a placa sobre um pano úmido para neutralizar as forças eletrostáticas.

2. Usar 1 cavidade da placa por amostra, incluindo sempre os controles positivo e negativo, prontos para uso.

ATENÇÃO: Não diluir os soros controles. Estes são fornecidos prontos para uso.

3. Utilizar diluição do soro 1/32 com a solução diluente (2). Recomenda-se diluir em um tubo de ensaio 10µl da amostra + 310µl da solução diluente.

4. Pipetar 25µl do soro controle positivo, negativo e da diluição 1/32 de cada amostra nas respectivas cavidades da placa. Sugere-se: A1 controle positivo, A2 controle negativo e A3, A4, A5... soros a serem testados.

5. Adicionar 25µl da suspensão homogênea de hemácias (1) em cada cavidade.

6. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placa) ou batendo com os dedos nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.

7. Deixar em repouso por 1 a 2 horas em temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).

8. Fazer leitura (ver procedimento semi quantitativo).

INTERPRETAÇÃO

Soros que dão reação negativa são informados como **NÃO REAGENTES** significam ausência de infecção atual ou progressa para toxoplasmose.

Nos casos em que ocorre reação negativa, mas com suspeita clínica de toxoplasmose, deve-se repetir o teste após alguns dias, pois pode tratar-se de período pré-sorológico.

Todos os soros que apresentam reação positiva deverão ser testados quantitativamente para determinação da fase da doença.

b. TESTE SEMI QUANTITATIVO

1. Partir de uma diluição do soro de 1/32 conforme item 3 do teste qualitativo.

2. Pipetar 25µl da solução diluente (2) a partir da segunda cavidade da placa até a diluição que se pretende estudar. Ex.: Se pretende diluir o soro até 1/512, pipetar 25µl do diluente nas cavidades A2, A3, A4 e A5. Não pipetar na A1.

3. Transferir 25µl da diluição do soro 1/32 para a primeira (A1) e segunda (A2) cavidades. Homogeneizar bem o soro com diluente na segunda cavidade

(diluição 1/64) e transferir 25µl para a terceira cavidade (diluição 1/128) e assim sucessivamente, desprezando 25µl no final.

4. Pipetar 25µl da suspensão homogênea de hemácias (1) em todas as cavidades.

5. Agitar a placa por vibração mecânica (agitador de placas) ou batendo com os dedos nas bordas da placa por 3 a 4 minutos.

6. Deixar em repouso por 1 a 2 horas na temperatura ambiente, em local livre de vibrações (IMPORTANTE).

7. Fazer leitura.

LEITURA

Reação Negativa: Quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade formando um botão.

Reação Positiva: Quando as hemácias se depositam no fundo da cavidade como um tapete, às vezes com bordas irregulares.

TÍTULO DA AMOSTRA: Maior diluição que mostra uma reação positiva. O ponto final é quando o tapete de hemácias cobre 50% do fundo da cavidade.

DETERMINAÇÃO DE INFECÇÃO RECENTE (IgM) OU PRESENÇA DE ANTICORPOS INESPECÍFICOS

O uso do 2-Mercaptoetanol possibilita a diferenciação, nos testes de hemaglutinação, de infecção recente ou presença de anticorpos inespecíficos.

PROCEDIMENTO

1. Realizar o teste do soro tratado com 2-Mercaptoetanol paralelo ao Teste Semi Quantitativo.

2. Tratamento do soro: pipetar em um tubo de ensaio 10µl de soro inativado ou não, 310µl da solução de 2-Mercaptoetanol diluído (corresponde a uma diluição 1:32). Incubar a 37°C por 1 hora.

INTERPRETAÇÃO

Teste Negativo: paciente não imune ou em fase pré-sorológica. Se houver suspeita clínica, repetir após 1 ou 2 semanas.

Títulos do soro tratado e não tratado com 2-ME semelhantes (menos de 2 diluições): Provável toxoplasmose progressa.

ATENÇÃO: este resultado não exclui infecção recente (presença de IgM) e, portanto, técnicas mais sensíveis como a imunofluorescência ou ELISA para detectar IgM devem ser usadas.

Queda de 2 ou mais títulos do soro tratado em relação ao não tratado: provável infecção recente (presença de IgM).

ATENÇÃO: se os títulos forem baixos e o tratado negativar, deve-se afastar a presença de anticorpos inespecíficos, repetindo-se o teste após 1 a 2 semanas e observando se ocorre aumento do título.

NOTA: O teste de hemaglutinação associado a técnicas mais sensíveis, como a imunofluorescência e/ou ELISA possibilita estabelecer perfis sorológicos que melhor caracterizam as fases da doença.

DESEMPENHO DO TESTE

Em 74 amostras verdadeiramente reagentes, realizadas pelas técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA com referência, o **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** da **WAMA** Diagnóstica não apresentou qualquer resultado falso negativo, conferindo ao **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** da **WAMA** Diagnóstica uma sensibilidade de 100%.

Em 268 amostras verdadeiramente não reagentes, também realizadas pelas técnicas de imunofluorescência indireta e ELISA como referência, o **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** da **WAMA** Diagnóstica apresentou 2 resultados falso positivos, conferindo uma especificidade de 99,3%.

PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

1. Uso diagnóstico in vitro.

2. USAR EXCLUSIVAMENTE A PLACA DO KIT, que não deve ser reutilizada.

3. Não utilizar reagentes de lotes diferentes

4. Ao deixar as placas em repouso, estas não devem sofrer vibrações, pois prejudica a qualidade da leitura.

5. As hemácias devem ser armazenadas em posição vertical correta para evitar autoaglutinação irreversível.

6. São aceitáveis variações de 1 a 2 títulos para um mesmo soro nas reações de hemaglutinação.

7. Todos os materiais humanos usados na preparação dos controles foram testados, com resultados negativos para anticorpo anti-HIV, antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e anti-HCV, porém, como nenhum método diagnóstico oferece completa segurança da ausência destes e de outros agentes infecciosos, recomenda-se tratar so soros controles humanos como materiais potencialmente infecciosos.

8. Não congelar os reagentes.

9. Como se emprega azida sódica a 0,095% como conservante, o descarte dos resíduos deve ser acompanhado de grande volume de água para evitar o acúmulo de resíduos de azida nos encanamentos, podendo formar sais fortemente explosivos.

10. Descarte o material conforme regulamentações locais.

11. 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 nucleated cells, the infection has a wide range of impact, such as chorioretinitis, myocarditis, pericarditis, pneumonia, myositis, meningoencephalitis, hepatitis; these infections can be isolated or combined, often diluting, particularly in patients with immunodeficiency or undergoing immunosuppressant therapy. The most serious problem of *T. gondii* infection is the congenital transmission during pregnancy. The severe compromise of the fetus may lead to the death of the fetus, death of the newborn or congenital disease, expressed by the following symptoms: hydrocephalus or microcephalus, Chorioretinitis, and brain calcification. The transplacental congenital transmission of the toxoplasmosis depends on the existence of the acute infection during the gestational phase; the earlier the gestational age, the greater the risk, being the highest risk during the first trimester.

Usually the beginning of the *T. gondii* infection is insidious, characterized by fever, adynamia, adenopathy, especially the cervical one; however, it frequently manifests in subclinical form, presenting in unpecific and light symptoms.

The toxoplasmosis diagnosis should never be made solely on the findings of clinical data. There is always the need to confirm it through laboratory tests and correct interpretation of the results.

The most important laboratory methods for the diagnosis of toxoplasmosis are: indirect immunofluorescence, passive hemaglutination and ELISA.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Fowl erythrocytes sensitised and stabilized with highly purified *Toxoplasma gondii* antigens show agglutination when react with antibodies against these antigens present in patient's serum.

KIT PRESENTATION

REF 36096-H (96 qualitative determinations)

1. Suspension of sensitised erythrocytes with *Toxoplasma gondii* (2.4ml)

2. Diluent solution (1x 40ml)

3. 2-Mercaptoethanol (1 x 0.5ml)

4. Positive serum control (1 x 1ml)

5. Negative serum control (1 x 1ml)

6. Disposable “V”-well microtitration plate (1x96 wells)

7. Instructions for use

REF 36192-H (192 qualitative determinations)

1. Suspension of sensitised erythrocytes with *Toxoplasma gondii* (1 x 4.8ml)

2. Diluent solution (1x60ml)

3. 2-Mercaptoethanol (1 x 0.5ml)

4. Positive serum control (1 x 1ml)

5. Negative serum control (1 x 1ml)

6. Disposable “V”-well microtitration plate (2x96 wells)

7. Instructions for use

REF 36380-H (380 qualitative determinations)

1. Suspension of sensitised erythrocytes with *Toxoplasma gondii* (2x4.8ml)

2. Diluent solution (2x60ml)

3. 2-Mercaptoethanol (1 x 1ml)

4. Positive serum control (1 x 1ml)

5. Negative serum control (1 x 1ml)

6. Disposable “V”-well microtitration plate(4x96 wells)

7. Instructions for use

REAGENT PREPARATION AND STABILITY

• **SUSPENSION OF SENSITISED ERYTHROCYTES (1):** Ready for use. Keep at 2-8°C. Do not freeze.

Homogenize the erythrocytes prior to use by inverting and round movements, never shake the vial since it can cause haemolysis and/or auto-agglutination.

• **DILUENT SOLUTION (2):** Ready for use. Keep at 2-30°C.

• **2-MERCAPTOETHANOL (3):** Protect from light. Dilute with the diluent solution (2). Ex: 10ml of diluent solution for 70µl of 2-mercaptoethanol (3). This mixture is intended to dilute the serum in order to determine a recent infection (IgM) or the presence of non-specific antibodies.

The solution can be diluted in ambar vial and stored at 2-8°C together with the kit. After preparing the diluent solution with 2-ME is stable for 30 days.

• **POSITIVE SERUM CONTROL (4):** Ready for use. Keep at 2-8°C.

• **NEGATIVE SERUM CONTROL (5):** Ready for use. Keep at 2-8°C.

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

SPECIMEN COLLECTION

Use fresh serum or stored at -20°C (maximum of 4 to 6 weeks) from fasting patients. The specimens must be at room temperature before using and do not need to be treated. Do not use hemolized, contaminated or lipemic serum.

Freezing and thawing cycles should be avoided. Old serum tend to become gelatinous in contact with 2-mercaptoethanol.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Test tubes
- Serological pipettes
- Tube support and rack
- Disposable material container

PROCEDURE

a. QUALITATIVE TEST (“Screening”)

Objective: Intended for screening and ruling out of non-reactive serum.

1. Lay the plate onto an humid cloth to avoid electrostatic.

2. Use 1 well for each specimen, including positive and negative controls.

ATTENTION: Do not dilute the controls. They are ready for use.

3. Dilute the serum 1/32 with diluent solution (2). It's recommended to dilute 10µl of

specimen + 310µl of diluent solution in a test tube.

4. Pipette 25µl of positive and negative controls and serum diluted at 1/32 of each sample on respective wells. Suggestion: A1 positive control, A2 negative control and A3, A4, A5...sera to be tested.

5. Add 25µl of suspension of erythrocytes (1) into each well.

6. Shake the plate by mechanical vibration (plate agitator) or beating with the fingers on the edges of the plate for 3 to 4 minutes.

7. Rest the plate for 1 to 2 hours in a place free of vibrations at room temperature (IMPORTANT).

8. Read the results. (See semi quantitative procedure).

INTERPRETATION

Serum that has a negative reaction are reported as NON-REACTIVE; they do not have current or previous toxoplasmosis infection. When one observes a negative reaction, but suspects toxoplasmosis, the test should be repeated after a few days since it may fall within the pre-serological period. All sera that gives positive reactions should be quantitatively tested to determine the stage of the disease

B. SEMI-QUANTITATIVE TEST

1. Dilute the serum 1/32 according to step 3 of qualitative test.

2. Pipette 25µl of diluent solution (2) from the second well of the plate up to dilution that is intended to evaluate. Ex: If the dilution of the serum is up to 1/512, pipette 25µl of diluent in the wells A2, A3, A4 and A5. Do not pipette in the well A1.

3. Transfer 25µl of the serum diluted at 1/32 in the wells A1 and A2 of the plate. Homogenize thoroughly the serum with diluent in the well A2 (dilution 1/64) and transfer 25µl in the well A3 (dilution 1/128) and so on. Discard 25µl in the end.

4. Pipette 25µl of erythrocytes homogeneous suspension (1) in all wells.

5. Shake the plate by mechanical vibration (plate vibrator) or by beating with the fingers on the edges of the plate for 3 to 4 minutes.

6. Rest the plate for 1 to 2 hours in a place free of vibrations at room temperature (IMPORANT).

7. Read the results.

READING

Negative: Erythrocytes form a compact button at the bottom of the well.

Positive: Erythrocytes form an even layer at the bottom of the well, like a rug, often presenting irregular edges.

TITER OF THE SPECIMEN: The highest dilution showing positive reaction. The endpoint is when the erythrocytes cover 50% of the bottom of the well.

DETERMINATION OF RECENT INFECTION (IgM) OR UNSPECIFIC ANTIBODIES

The use of 2- mercaptoethanol, on the hemagglutination tests, offers the possibility to differentiate the recent infection or the presence of non-specific antibodies.

PROCEDURE

1. Perform the test with 2-Mercaptoethanol in parallel to Quantitative Test.

2. Serum treatment: Pipette 10µl of the activated or inactivated serum + 310µl of diluted 2-Mercaptoethanol (1/32 solution) in a test tube. Incubate at 37°C for 1 hour.

INTERPRETATION

- Negative: Patients non-immune or in pre-serological stage. When in doubt, repeat the test after 1 or 2 weeks.

- Titers of serum that have been treated and non-treated (with 2-mercaptoethanol) that are similar (less than 2 dilutions): Probably previous toxoplasmosis infection.

ATTENTION: This result does not exclude recent infection (IgM) and therefore, immunofluorescence and ELISA for IgM detection are recommended.

- Difference of 2 or more titers for the treated serum versus the non-treated (with 2-mercaptoethanol): Probably recent infection (IgM)

ATTENTION: If titers are low and treated serum is negative, to rule out the presence of unspecific antibodies, repeat the test after 1 to 2 weeks and observe if the titer is higher.

NOTE: The hemagglutination test associated with more sensitive methods such as immunofluorescence and/or ELISA enables one to establish serological profiles that best characterizes the disease stage.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In a study on 74 true reactive specimens performed by indirect immunofluorescence and ELISA methods, the **Imuno-HAI TOXOPLASMOSE** from **WAMA** Diagnóstica showed no false negative results which represents a sensitivity of 100%.

Another study on 268 true negative specimens performed by indirect immunofluorescence and ELISA methods, the **Imuno-HAI TOXOPLASMOSE** from **WAMA** Diagnóstica showed 2 false positive results which represents a specificity of 99.3%.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

1. In vitro diagnostic.

2. USE ONLY THE PLATE THAT COMES WITH THE KIT PLATE. It should not be reused.

3. Do not use reagents from different lots.

4. When reading the plate, the plate should not vibrate since it can affect the reading results.

5. Erythrocytes vial should be let stand in vertical position to avoid irreversible auto-agglutination.

6. It is acceptable variations of 1 or 2 titers for the same serum on hemagglutination reactions.

7. All human components used in the preparation of the controls have been tested (and found negative) for anti-HIV, HBsAg, and anti-HCV. However, since no diagnostic method can give full assurance of the absence of these and other infectious agents, it's recommended to treat the human serum controls as potentially infective materials

8. Do not freeze the reagents.

9. Sodium azide 0.095% is used as preservative. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent azide buildup in the plumbing, which can become explosive.

10. Disposal in accordance with local regulations.

11. Follow good laboratory practices (GLP) related to storage, handling and material disposal.

WARRANTY

WAMA Diagnóstica replaces this kit since it is not beyond expiration date. The returned kit must be evaluated by Wama's technical support. The warranty will be invalid and kit will not be replaced if technical support finds evidence that running, handling and storage were not properly followed.

ESPAÑOL

IMPORTANCIA CLÍNICA

La toxoplasmosis es una infección causada por un protozooario, el *Toxoplasma gondii*. Como el puede parasitar todas las células enucleadas, las manifestaciones clínicas pueden ser multe variable, tales como: corriorretinitis, miocarditis, pericarditis, neumonías, miosotis, 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 compromiso 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 compromiso fetal, sendo que el compromiso 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 inespecificos.

El diagnóstico de la toxoplasmosis jamás podrá ser establecido con base en datos puramente clínicos. Hay siempre 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, la hemoaglutinación pasiva y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

PRINCIPIO DO MÉTODO

Eritrocitos de aves estabilizados, sensibilizados con componentes antigénicos del *Toxoplasma gondii* altamente purificados, muestran aglutinación cuando reaccionan con anticuerpos contra esos antígenos presentes en el suero.

PRESENTACIÓN DEL KIT

REF 36096-H (96 determinaciones)

- Suspensión de hemáties sensibilizadas con componentes del *Toxoplasma gondii*. (1 x 2,4ml)
- Solución diluyente (1x40ml)
- 2-Mercaptoetanol (1 x 0,5ml)
- Suero control positivo (1 x 1ml)
- Suero control negativo(1 x 1ml)
- Placas de micro titulación desechables con fondo en "V" (1x96 cavidades)
- Instrucciones para el uso

REF 36192-H (192 determinaciones cualitativas)

- Suspensión de hemáties sensibilizadas con componentes del *Toxoplasma gondii*. (1 x 4,8ml)
- Solución diluyente (2x60ml)
- 2-Mercaptoetanol (1 x 0,5ml)
- Suero control positivo (1 x 1ml)
- Suero control negativo(1 x 1ml)
- Placas de micro titulación desechables con fondo en "V" (2x96 cavidades)
- Instrucciones para el uso

REF 36380-H (380 determinaciones)

- Suspensión de hemáties sensibilizadas con componentes del *Toxoplasma gondii*. (2x4,8ml)
- Solución diluyente (1x60ml)
- 2-Mercaptoetanol (1 x 1ml)
- Suero control positivo (1 x 1ml)
- Suero control negativo(1 x 1ml)
- Placas de micro titulación desechables con fondo en "V" (4x96 cavidades)
- Instrucciones para el uso

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

• **SUSPENSIÓN DE HEMATÍES SENSIBILIZADAS (1):** Listo para el uso. Conservar entre 2-8°C. No congelar.

Homogeneizar bien las hemáties antes del uso, siempre con movimientos circulares del frasco entre las manos y por inversión del frasco; nunca por agitación, pues esta puede acarrear hemólise y/o auto aglutinación.

• **SOLUCIÓN DILUYENTE (2):** lista para el uso Conservar entre 2-30°C.

• **2-MERCAPTOETANOL (3):** Conservar al abrigo de luz. Deberá ser diluido con la solución diluyente (2), en proporción 10ml de la solución diluyente para 70µl de 2-mercaptoetanol (3). Esta solución diluyente con 2-mercaptoetanol es usada para diluir la muestra si el suero para la determinación de infección reciente (IgM) o presencia de anticuerpos inespecificos. La solución puede ser diluida en frasco ámbar y conservadas entre 2-8°C juntamente con el kit. Después de preparar la solución diluyente con 2-ME es estable por 30 días.

• **SUERO CONTROL POSITIVO (4):** listo para el uso. Conservar entre 2-8°C.

• **SUERO CONTROL NEGATIVO (5):** listo para el uso. Conservar entre 2-8°C. El kit mantiene el mismo desempeño después del primer uso, y es estable hasta la fecha de desde que sea mantenido en la temperatura de 2-8°C.

MUESTRAS

Usar sueros frescos o conservados a –20°C (Maximo de 4 a 6 semanas) de pacientes en ayuno. Los sueros debem estar a temperatura ambiente antes del uso y no necessitam de ninguno tratamiento. No utilice suero hemolizado, contaminado o lipemico. Evitar el congelamiento y descongelamiento repetidos del suero. Los sueros envejecidos tienden a gelificar al contacto con el 2-mercaptoetanol.

MATERIAL NECESARIO, PERO NO FORNECIDO

-Tubos de ensayo

-Pipetas suerológicas

-Estante de tubos y rack

-Recipiente para el descarte del material

PROCEDIMIENTO

a. Teste cualitativo ("Sreening")

Objetivo: para la selección y eliminación de los sueros en el reactivos.

1. Colocar la placa sobre un paño húmedo para neutralizar las fuerzas electrostáticas.

2. Usar 1 cavidad de placa por la muestra, incluyendo siempre los controles positivo y negativo.

ADVERTENCIA: No diluir el suero e control. Listos para el uso.

3. Utilizar dilución del suero 1/32 con la solución diluyente (2).Recomienda se diluir en un tubo de ensayo 10µl de la muestra +310µl de la solución diluyente.

4. Pipetar 25µl del suero control positivo, negativo de la dilución 1/32 de cada muestra en las respectivas cavidades de la placa. Sugiere se: A1 control positivo, A2 control negativo y A3, A4 e A5...sueros a ser testados.

5. Adicionar 25µl de la suspensión homogénea de hemáties (1) y cada cavidad.

6. Agitar la placa por vibración mecánica (agitador de placa) o golpeando con los dedos en las bordas de la placa por 3 a 4 minutos.

7. Dejar en reposo por 1 a 2 horas en temperatura ambiente, en local libre de vibraciones (importante).

8. Hacer la lectura (ver procedimiento semi cuantitativo)

INTERPRETACIÓN

Sueros que dan reacción negativa son informados como NO REACTIVOS significan ausencia de infección actual o pregresa para toxoplasmosis. En los casos en que ocurre reacción negativa, las con sospecha clínica de toxoplasmosis, debe repetir el teste después de algunos días, pues puede tratar de un período pré-serológico.

Todos los sueros que presentan reacción positiva deberán ser testados cuantitativamente para la determinación de la fase de la enfermedad.

b. Teste Semi cuantitativo

1. Partir de una dilución do soro de 1/32 conforme ítem 3 de los teste cualitativo.

2. Pipetar 25µl de la solución diluyente (2) a partir de la segunda cavidad de placa hasta la dilución que se pretende estudiar, Ejemplo: Si pretende diluir el suero hasta 1/512, pipetar 25µl del diluyente en las cavidades A2, A3, A4 e A5. No pipetar en A1.

3. Transferir 25 µl de la dilución del suero 1/32 para la primera (A1) y segunda (A2) cavidades. Homogeneizar bie el suero en la segunda cavidad (dilución 1/64) y transferir 25 µl para la tercera cavidad (dilución 1/128) y asi sucesivamente, despresando 25ul en el final.

4. Pipetar 25 µl de la suspensión homogénea de hemáties (1) en todas las cavidades.

5. Agitar la placa por vibración mecánica (agitador de placas) o golpeando con los dedos en las bordas de la placa por 3 a 4 minutos.

6. Dejar en reposo por 1 a 2 horas en temperatura ambiente, en local libre de vibraciones (importante).

7. Hacer la lectura.

LECTURA

Reacción negativa: Cuando las hematíes se depositan en el fondo de la cavidad formando un botón.

Reacción positiva: Cuando las hematíes se depositan en fundo de la cavidad como una alfombra, las veces con bordas irregulares.

Título de las muestra: Mayor dilución que muestra una reacción positiva. El punto final es cuando la alfombra de hematíes 50% del fondo de la da cavidad. Determinación de Infección Reciente (IgM) o Presencia de Anticuerpos Inespecificos

El uso do 2-Mercaptoetanol posibilita la diferenciación, en los testes de hemoaglutinación, de infección reciente o presencia de anticuerpos inespecificos.

PROCEDIMIENTO

1. Realizar el teste del suero tratado con 2-Mercaptoetanol paralelo al Teste Semi cuantitativo.

2. Tratamiento del suero: pipetar en un tubo de ensayo 10µl de suero inactivado o en el, 310µl de la solución de 2-Mercaptoetanol diluido (corresponde a una dilución 1/32). Incubar a 37°C por 1 hora.

INTERPRETACIÓN

Teste negativo: paciente no inmune o en fase pré-serológica. Si hay sospecha clínica, repetir después de 1 o 2 semanas.

Títulos de suero tratado y no tratado con 2-ME semejantes (menos de 2 diluciones): probable toxoplasmosis pregresa.

Atención: ese resultado no excluye infección reciente (presencia de IgM) y, por lo tanto, técnicas mas sensibles como la inmunofluorescencia o ELISA para detectar IgM deben ser usadas.

Queda de 2 o mas títulos de suero tratado en relación al en el tratado: probable

infección reciente (presencia de IgM)

Atención: si los títulos fueren bajos y el tratado negativar, debe se alejar la presencia de anticuerpos inespecificos, repitiendo el teste después 1 a 2 semanas y observando si ocurre aumento del título.

Nota: El teste de hemoaglutinación asociado a las técnicas mas sensibles, como la inmunofluorescencia y/o ELISA posibilita establecer perfiles suerológicos que mejor caracterizan las fases de la enfermedad.

DESEMPEÑO DEL TESTE

En 74 muestras verdaderamente reactivos, realizadas por las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA como referencia, el **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** de la **WAMA** Diagnóstica no presenta cualquier resultado falso negativo, confiando al **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** de la **WAMA** Diagnóstica una sensibilidad de 100%.

En 268 muestras verdaderamente no reactivos, también realizadas por la técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA como referencia, el **Imuno HAI TOXOPLASMOSE** de la **WAMA** Diagnóstica presento 2 resultados falso positivos, confiando una especificidad de 99,3%.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

1. Uso diagnostico in vitro.

2. USAR EXCLUSIVAMENTE LA PLACA DEL KIT, que no debe ser reutilizada.

3. Al dejar las placas en reposo, estas no deben sufrir vibraciones, pues perjudica la calidad de la lectura.

4. No utilizar reactivos de lotes diferentes.

5. Las hematies deben ser almacenadas en posición vertical correcta para evitar auto aglutinación irreversible.

6. Son aceptables variaciones de 1 a 2 títulos para un mismo suero en las reacciones de hemoaglutinación.

7. Todos los materiales humanos usados en la preparación de los controles fueren testados, con resultados negativos para anticuerpo anti-VIH, antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg) y anti-HCV, seguridad de la ausencia de esos e de otros agentes infecciosos, recomienda-se tratar los sueros controles humanos como materiales potencialmente infecciosos.

8.no congelar los reactivos.

9. Como se emplea azida sódica a 0,095% como conservante, el descarte de los residuos debe ser acompañado de grande volúmenes de agua para evitar el acumulo de residuos de azida en las tuberías, pudiendo formar sales fuertemente explosivos.

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

11.Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en la conservación, manoseo y descarte de los materiales.

TERMINO DE GARANTÍA

La WAMA Diagnóstica garantiza el cambio de este conjunto diagnostico si desde el momento que el mismo está dentro el plazo de caducidad y sea comprobado por su accesoria 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 estas condiciones.

BIBLIOGRAFIA/ BIBLIOGRAPHY/ BIBLIOGRAFÍA

- 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. Trop. S. Paulo**, 6(3): 117-118, 1964.
- Camargo, M. E.; Lesser, 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, 1976.
- Guertina, 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 Diag.**, 17: 1047-1054, 1997
- Hollmann, R., E.: Recent developments in the diagnosis of toxoplasmosis. **Serodiagn, Immunother. Infect. Dis.**, 8: 9-16, 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., Tenover, M.*, Tenover, F.C. and Tenover, F.C. (editors), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., ASM Press, Washington, D.C.: 1374-1382, 1999.
- Wong, S.Y. and Remington, J.S.: Toxopimosis 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 <i>in vitro</i> In vitro diagnostic Producto diagnóstico <i>in vitro</i>		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 Europeo		Fabricado por Manufactured by Fabricado por

VI Edição: Rev. 06/2011