

VetLine Toxoplasma IgM

ELISA

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von Antikörpern gegen Toxoplasma gondii in Serumproben von Katzen.

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of antibodies against Toxoplasma gondii in serum samples from cats.

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos contra Toxoplasma gondii en muestras de suero de gatos.

| | |
|--|----|
| Deutsch..... | 2 |
| English | 7 |
| Español..... | 12 |
| Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografía / Bibliografía / Bibliografía | 18 |
| Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas | 18 |
| Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos | 19 |
| Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste | 20 |

Gebrauchsinformation

Die deutsche Gebrauchsinformation ist nach § 11 Absatz 2 TierGesG zugelassen.

Zulassungs-Nr.:

FLI-C 091

1. EINLEITUNG

Toxoplasma gondii, der Erreger der Toxoplasmose, ist ein intrazellulärer, ubiquitärer Gewebeparasit. Endwirte des Erregers sind Hauskatzen und andere Feliden. In Feliden als Endwirte findet die geschlechtliche und wie in anderen Zwischenwirten eine ungeschlechtliche Entwicklung von *Toxoplasma gondii* statt. Als Zwischenwirte sind weltweit über 200 Vogel- und Säugetierarten inklusive des Menschen und Nutztieren wie Schweine, Rinder und Schafe bekannt. In Zwischenwirten findet ausschließlich die ungeschlechtliche Vermehrung des Erregers durch Endodyogenie statt.

Katzen und andere Feliden infizieren sich mit *Toxoplasma gondii* meist durch Aufnahme von Bradyzoiten in Gewebezysten im Fleisch infizierter Beutetiere oder durch die Aufnahme von Oozysten. Oozysten werden mit dem Kot von Feliden ausgeschieden. Die ausgeschiedenen Oozysten werden nach einer Reifezeit von etwa 2-5 Tagen (Sporulation) infektiös. Sie sind außerordentlich resistent und können in feuchter Erde mehrere Monate bis Jahre infektiös bleiben.

Im Verlauf der Infektion mit *Toxoplasma gondii* bilden sich in Muskulatur, inneren Organen, Retina und Gehirn des Wirtes Gewebezysten. Sie stellen eine intrazelluläre Dauerform der Parasiten dar.

Symptomatik bei Katzen:

Bei Katzen verläuft eine Infektion in der Regel asymptomatisch. Während einer ca. zwei- bis dreiwöchigen Ausscheidungsphase von Oozysten kommt es gelegentlich zu unspezifischen Symptomen wie leichtem Durchfall, Lymphknotenschwellungen und einer Erhöhung der Körpertemperatur.

Bei immunsupprimierten Katzen (z.B. Erkrankungen an FIP, FeLV und FIV) treten häufiger Symptome wie Fieber, Atembeschwerden, Lungenentzündung, Magen-Darm-Erkrankung, Hepatitis, Erkrankungen der Augen oder Störungen des zentralen Nervensystems auf.

Besonders schwere Verläufe, zeigen sich häufig bei intrauterin infizierten Katzenwelpen. Diese führen meist recht schnell zu Tod der Tiere.

Katzen sind als Ausscheider von Oozysten zoonotisch relevant.

Der Nachweis einer Toxoplasma-Infektion bei der Katze unterliegt in Deutschland der Meldepflicht.

Toxoplasmose gehört zu den häufigsten Zoonosen. Der Menschen kann sich durch zufällige Aufnahme von der Katze ausgeschiedener Oozysten, z.B. bei der Gartenarbeit infizieren oder durch den Verzehr von rohem bzw. unzureichend erhitzten Fleisches infizierter Tiere (z.B. Rohwurst). Gefährlich ist eine Erstinfektion mit *Toxoplasma gondii* während der Schwangerschaft. Gelingt dem Erreger der Übertritt in fötales Gewebe, kann es zu schweren Schädigungen des Fetus führen und eine Fehlgeburt auslösen.

Die Reaktivierung einer bestehenden Infektion bei immunsupprimierten Menschen kann schwere Erkrankungen auslösen oder sogar zum Tod führen.

Nachweis des Erregers:

- Antikörpernachweis mittels Immunfluoreszenztest oder ELISA
- Mikroskopischer Erregernachweis in Gewebeproben oder Kotproben
- Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion in Gewebeproben oder Kotproben

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec VetLine Toxoplasma IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* im Serum von Katzen bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Toxoplasma Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH $7,2 \pm 0,2$; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH $7,2 \pm 0,2$; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), $< 0,1\%$; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsinformation
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung
- Mikropipetten (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Toxoplasma gondii Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 ml Waschpuffer + 190 ml destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten Serumproben von Katzen verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µl Probe und 1 ml Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µl Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86: 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

Mittlere Extinktion der Probe x 10
Cut-off = [NovaTec Einheiten = NTU]

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Probenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Folgende Angaben gelten als Richtlinien:

| | | |
|-------------|------------|--|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positiv | > 11 NTU | Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen hat stattgefunden. |
| Grenzwertig | 9 – 11 NTU | Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Probe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ . |
| Negativ | < 9 NTU | Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen ist unwahrscheinlich. |

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

10. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Die Leistungsdaten wurden mit Serumproben von Katzen bestimmt.

10.1. Präzision

| Intraassay | n | Mittelwert (E) | Vk (%) |
|------------|----|----------------|--------|
| #1 | 24 | 1,228 | 3,40 |
| #2 | 24 | 0,719 | 2,85 |
| #3 | 24 | 0,421 | 4,07 |

| Interassay | n | Mittelwert (NTU) | Vk (%) |
|------------|----|------------------|--------|
| #1 | 12 | 23,58 | 7,12 |
| #2 | 12 | 19,74 | 6,28 |
| #3 | 12 | 6,92 | 7,11 |

10.2. Relative diagnostische Spezifität

Die relative diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern (relativ zu den Ergebnissen anderer serologischer Tests).

Relative diagnostische Spezifität Katzen: > 98 % (95 % Konfidenzintervall: 87,23 % - 100,0 %)

10.3. Relative diagnostische Sensitivität

Die relative diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern (relativ zu den Ergebnissen anderer serologischer Tests).

Relative diagnostische Sensitivität Katzen: 93,94 % (95 % Konfidenzintervall: 79,77 % - 99,26 %)

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,5 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen können nicht ausgeschlossen werden.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Nur für veterinärmedizinische in-vitro-Diagnostik.

- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

12.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



| | |
|-----------|---|
| H317 | Kann allergische Hautreaktionen verursachen. |
| P261 | Einatmen von Aerosol vermeiden. |
| P280 | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen. |
| P302+P352 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen. |
| P333+P313 | Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P362+P364 | Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen |

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

12.2. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: TOXVM0460 VetLine Toxoplasma IgM ELISA (96 Bestimmungen)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Toxoplasma gondii, the causative agent of toxoplasmosis, is an intracellular, ubiquitous tissue parasite. The final hosts of the pathogen are domestic cats and other felids. In felids as final hosts, the sexual development, and as in other intermediate hosts, the asexual development of *Toxoplasma gondii* takes place. Over 200 species of bird and mammals, including humans and farm animals such as pigs, cattle and sheep are known as intermediate hosts worldwide. In intermediate hosts only asexual reproduction of the pathogen by endodyogeny takes place.

Cats and other felids are usually infected with *Toxoplasma gondii* by ingesting bradyzoites in tissue cysts in the meat of infected prey or by ingesting oocysts. Oocysts are excreted with the feces of felids.

The excreted oocysts become infectious after a maturation period of about 2-5 days (sporulation). They are extremely resistant and can remain infectious in moist soil for several months to years.

In the course of infection with *Toxoplasma gondii*, tissue cysts form in the muscles, internal organs, retina and brain of the host. They represent an intracellular form of the parasites.

Symptoms in cats:

In cats, infection is usually asymptomatic. During an approximately two to three weeks excretion phase of oocysts, there are occasional non-specific symptoms such as mild diarrhea, swelling of the lymph nodes and an increase in body temperature.

In immunosuppressed cats (e.g. diseases of FIP, FeLV and FIV) symptoms such as fever, difficulty breathing, pneumonia, gastrointestinal disease, hepatitis, eye disorders or central nervous system disorders occur more often.

Extremely severe courses are often seen in intrauterine infected kitten. These usually lead to the death of the animals very quickly.

Cats are relevant for zoonotic excretion of oocysts.

Proof of a *Toxoplasma* infection in cats is subject to reporting in Germany.

Toxoplasmosis is one of the most common zoonoses. Humans may become accidentally infected by ingestion of oocysts excreted by the cat, e.g. infected while gardening or by eating raw or underheated meat from infected animals (e.g. raw sausage). An initial infection with *Toxoplasma gondii* during pregnancy is dangerous. If the pathogen is able to enter fetal tissue, it can cause severe damage to the fetus and cause a miscarriage. The reactivation of an existing infection in immunosuppressed people can cause serious disease or even death.

Evidence of the pathogen:

- Antibody detection using an immunofluorescence test or ELISA
- Microscopic detection of pathogens in tissue or fecal samples
- Detection by means of polymerase chain reaction in tissue samples or fecal samples

2. INTENDED USE

The NovaTec VetLine *Toxoplasma* IgM ELISA is intended for the qualitative determination of specific IgM antibodies against *Toxoplasma gondii* in serum samples from cats.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Toxoplasma gondii* antigens; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 ml of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20ml of peroxidase labelled antibody to IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; white cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Toxoplasma gondii* antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 ml Washing Buffer + 190 ml distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use serum samples from cats with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µl sample and 1 ml Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Buffer from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µl standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µl Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.3. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own sample populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

| | | |
|-----------|------------|--|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positive | > 11 NTU | Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen. |
| Equivocal | 9 – 11 NTU | Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative . |
| Negative | < 9 NTU | The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen is unlikely. |

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

The performance data have been established with serum samples from cats.

10.1. Precision

| Intraassay | n | Mean (E) | CV (%) |
|-------------------|----------|-----------------|---------------|
| #1 | 24 | 1.228 | 3.40 |
| #2 | 24 | 0.719 | 2.85 |
| #3 | 24 | 0.421 | 4.07 |

| Interassay | n | Mean (NTU) | CV (%) |
|-------------------|----------|-------------------|---------------|
| #1 | 12 | 23.58 | 7.12 |
| #2 | 12 | 19.74 | 6.28 |
| #3 | 12 | 6.92 | 7.11 |

10.2. Relative Diagnostic Specificity

The relative diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte (relative to the results of other serological tests).

Relative Diagnostic Specificity cats: > 98 % (95 % confidence interval: 87.23 % - 100.0 %)

10.3. Relative Diagnostic Sensitivity

The relative diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte (relative to the results of other serological tests).

Relative Diagnostic Sensitivity cats: 93.94 % (95 % confidence interval: 79.77 % - 99.26 %)

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.5 mg/ml bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Cross reactions cannot be excluded.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Only for veterinary in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

12.1 Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



| | |
|-----------|--|
| H317 | May cause an allergic skin reaction. |
| P261 | Avoid breathing spray |
| P280 | Wear protective gloves/protective clothing. |
| P302+P352 | IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. |
| P333+P313 | If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. |
| P362+P364 | Take off contaminated and Wash it before reuse. |

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: TOXVM0460 VetLine Toxoplasma IgM ELISA (96 Determinations)

1. INTRODUCCIÓN

El *Toxoplasma gondii*, el agente causante de la toxoplasmosis, es un parásito de tejido intracelular y ubicuo. Los huéspedes definitivos del patógeno son los gatos domésticos y otros felinos. En los felinos como huéspedes finales, tiene lugar el desarrollo sexual y, como en otros huéspedes intermedios, el desarrollo asexual de *Toxoplasma gondii*. Más de 200 especies de aves y mamíferos, incluidos los seres humanos y los animales de granja como los cerdos, el ganado y las ovejas, se conocen como huéspedes intermedios en todo el mundo. En huéspedes intermediarios, solo la reproducción asexual del patógeno tiene lugar a través de la endodiogenia.

Los gatos y otros felinos suelen infectarse con *Toxoplasma gondii* al ingerir bradizoítos en quistes de tejido en la carne de las presas infectadas o al ingerir ooquistes. Los ooquistes son excretados con sus heces de los felinos. Los ooquistes excretados se vuelven infecciosos después de un período de maduración de unos 2-5 días (esporulación). Son extremadamente resistentes y pueden permanecer infecciosos en el suelo húmedo durante varios meses o años.

En el curso de la infección por *Toxoplasma gondii*, se forman quistes en el tejido de los músculos, órganos internos, retina y cerebro del huésped. Representan una forma intracelular de los parásitos.

Síntomas en los gatos:

En los gatos, la infección suele ser asintótica. Durante una fase de excreción de ooquistes de aproximadamente dos o tres semanas, hay síntomas ocasionales no específicos como diarrea leve, hinchazón de los ganglios linfáticos y un aumento de la temperatura corporal.

En los gatos inmunodeprimidos (por ejemplo, las enfermedades de Virus de Inmunodeficiencia Felina, (FIV), Virus de la Leucemia Felina FeLV y peritonitis infecciosa felina (FCoV) los síntomas como la fiebre, la dificultad para respirar, la neumonía, las enfermedades gastrointestinales, la hepatitis, los trastornos oculares o los trastornos del sistema nervioso central se producen con mayor frecuencia.

A veces se observan cursos extremadamente graves en gatitos infectados intrauterinos. Éstos suelen provocar la muerte de los animales muy rápidamente.

Los gatos son relevantes para la excreción zoonótica de ooquistes.

La evidencia de una infección por *Toxoplasma* en gatos está sujeta a informes en Alemania.

La toxoplasmosis es una de las zoonosis más comunes. Los seres humanos pueden infectarse accidentalmente por la ingestión de ooquistes excretados por el gato, por ejemplo, infectados durante la jardinería o por comer carne cruda o mal calentada de animales infectados (por ejemplo, salchichas crudas). Una infección inicial con *Toxoplasma gondii* durante el embarazo es peligrosa. Si el patógeno es capaz de entrar en tejido fetal, puede causar graves daños al feto y provocar un aborto.

La reactivación de una infección existente en personas inmunodeprimidas puede provocar una enfermedad grave o incluso la muerte.

Evidencia del patógeno:

- Detección de anticuerpos mediante una muestra de inmunofluorescencia o ELISA
- Detección microscópica de patógenos en muestras de tejido o fecales
- Detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de tejido o muestras fecales

2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático de NovaTec VetLine *Toxoplasma* IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de IgM anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii* en muestras de suero de gatos.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Toxoplasma gondii*, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestras:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de Parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 ml de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca.

- **Conjugado:** 1 botella de 20 ml de conjugado de anticuerpos IgM con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa blanca; listo para ser utilizado.
- **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ l)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 ml de la Tampón de Lavado + 190 ml de agua destilada. La Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2...8 °C. Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero de gatos con este ensayo. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras, por ejemplo 10 μ l de la muestra con 1 ml de Tampón de Dilución de Muestras, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µl a 350 µl para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µl de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µl de la Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20\dots25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µl de la Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20\dots25^\circ\text{C}$).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µl de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esto debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la **esquema de la placa**.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción **< 0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción **< 0,200 y < Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción **> Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de lo Control cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86:2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [NTU]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-unidades} = \text{NTU}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretación de los resultados

Los intervalos de valores normales para el ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio con base en las muestras de la propia población en las áreas geográficas atendidas.

Estos son los datos normativos:

| | | |
|--|------------|---|
| Cut-off | 10 NTU | - |
| Positivo | > 11 NTU | Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno. |
| Zona intermedia | 9 – 11 NTU | Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa . |
| Negativo | < 9 NTU | La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno es poco probable. |
| El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología junto al resultado serológico. | | |

10. PERFORMANCES DU TEST

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Los datos de rendimiento se han determinado con muestras de suero de gatos.

10.1. Precisión

| <u>Intra ensayo</u> | <u>n</u> | <u>Promedio (E)</u> | <u>CV (%)</u> |
|---------------------|----------|---------------------|---------------|
| #1 | 24 | 1,228 | 3,40 |
| #2 | 24 | 0,719 | 2,85 |
| #3 | 24 | 0,421 | 4,07 |

| <u>Inter ensayo</u> | <u>n</u> | <u>Promedio (NTU)</u> | <u>CV (%)</u> |
|---------------------|----------|-----------------------|---------------|
| 11. #1 | 12 | 23,58 | 7,12 |
| 12. #2 | 12 | 19,74 | 6,28 |
| 13. #3 | 12 | 6,92 | 7,11 |

13.1. Especificad Diagnóstica Relativa

La especificidad relativa del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico (relativo a los resultados de otras pruebas serológicas).

Especificad diagnóstica relativa gatos: > 98 % (95 % Intervalo de confianza: 87,23 % - 100,0 %)

13.2. Sensibilidad de Diagnóstico Relativa

La sensibilidad relativa del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico (relativo a los resultados de otras pruebas serológicas).

Sensibilidad de diagnóstico relativa gatos: 93,94 % (95 % Intervalo de confianza: 79,77 % - 99,26 %)

13.3. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos, de 0,5 mg/ml para bilirrubina y de 10 mg/ml hemoglobina.

13.4. Reacción cruzada

Las reacciones cruzadas no pueden ser excluidas.

14. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

15. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- Solo para diagnósticos veterinarios in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

15.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



| | |
|-----------|---|
| H317 | Puede provocar una reacción alérgica en la piel. |
| 261 | Evitar respirar el aerosol. |
| P280 | Llevar guantes/prendas. |
| P302+P352 | EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua. |
| P333+P313 | En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. |
| P362+P364 | Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. |

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

15.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligrosos.

16. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: TOXVM0460 VetLine Toxoplasma IgM ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

Human

A. Balsari et al. ELISA for *Toxoplasma* antibody detection: a comparison with other serodiagnostic tests. *J. Clin. Pathol.*, 33: 640 (1980)

M.H. Beaman, R.E. McCabe, S-Y. Wong, J.S. Remington, *Toxoplasma gondii*, Inc: Principles and Practice of Infectious Diseases, G.L. Mandell, J.E. Bennet, R. Dolin, eds., Churchill Livingstone Publ., Fourth edition, p. 2455-2475 (1995)

A. Bondiolo et al. ELISA for *Toxoplasma* antibodies. Inc: Immunoenzyme Assay Techniques, R. Malvano ed., M. Nijhoff Publ. (1980)

M.E. Camargo et al. Immunoglobine G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serological patterns. *Inf. Immun.*, 21:55 (1978)

Y. Carlier et al. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. *Bull. World Health Organization*, 58 (1): 99 (1980)

Sheep

Proctor AF et al. **Detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in serum from experimentally infected pregnant ewes.** University College Dublin, 2008

Mangili, P.M. et al. **Development and evaluation of the performance of an in-house ELISA to be used for the indirect diagnosis of Toxoplasmosis in sheep.** Poster presented at the SIDILV meeting in Parma, Italy, 2009.

Swine

Hotea, I. et al. **Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in pigs reared in intensive system from Timis country.** *Lucrari Stiintice Medicina veterinara* Vol. XLIII(1), 2010, Timisoara.

Görlich, K. et al. **Validation, optimisation and standardisation of an automated test system for monitoring and surveillance of *Toxoplasmosa gondii* in pigs.** 2010. Poster presented at Nationales Zoonose Symposium, Berlin, 2009.

Gómez-Laguna, J. et al. **Seroprevalence of zoonotic diseases in Iberian pigs.** SUIS N° 74, Enero/Febrero 2011.

Deer

Gaffuri, A., et al. ***Toxoplasma gondii* in wild boar and roe deer in Northern Italy: serosurvey and PCR-RFLP.** 9th Ewda Conference, 2010.

Renzi, M. et al. **Serological investigation on the spread of *Toxoplasma gondii* in roe deer (*Capreolus capreolus*) Emilia-Romagna.** Poster presented at the 3rd National SIEF Congress, Torino, 2009.

Dogs and cats

Scarpulla, M. et al. **Comparison of indirect immunofluorescence and ID Screen® Toxoplasmosis indirect ELISA for the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cat and dog sera.** Poster presented at the WAVLD meeting, Madrid, 2009.






Wild & domestic animals

Roqueplo, C. et al. ***Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia.** *Parasite*, 2011, 18, 345-348.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

| | |
|------|--|
| CMIT | 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one |
| MIT | 2-methyl-2H-isothiazol-3-one |

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

| | |
|---|---|
|  | Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por |
| LOT | Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote |
|  | Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade |
|  | Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento |
| REF | Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo |
|  | Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização |
| MTP | Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulación / Placa de Microtitulação |
| CONJ | Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado |
| CONTROL - | Negative Control / Negativkontrolle / Contrôle Négatif / Controllo Negativo / Control Negativo / Controle Negativo |
| CONTROL + | Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle Positif / Controllo Positivo / Control Positivo / Controle Positivo |
| CUT OFF | Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Contrôle Cut-off / Controllo Cut-off / Control Cut-off / Controle Cut-off |
| DIL | Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon / Tampone di Diluizione del Campione / Tampón de Dilución de Muestras / Tampão de Diluição de Amostra |
| SOLN STOP | Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio |
| SUB TMB | TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución de Sustrato de TMB / Solução Substrato TMB |
| WASH BUF 20x | Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampón de Lavado concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x |
|  | Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes |

SCHEME OF THE ASSAY

VetLine Toxoplasma IgM ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

| | Substrate Blank (A1) | Negative Control | Cut-off Control | Positive Control | Sample (diluted 1+100) |
|---|-------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| Negative Control | - | 100 µl | - | - | - |
| Cut-off Control | - | - | 100 µl | - | - |
| Positive Control | - | - | - | 100 µl | - |
| Sample (diluted 1+100) | - | - | - | - | 100 µl |
| Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37±1 °C Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer | | | | | |
| Conjugate | - | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µl of Washing Buffer | | | | | |
| TMB Substrate Solution | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark | | | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm) | | | | | |

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
 63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
 Email: info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629