ELI.H.A TOXO

Diagnóstico serológico de Toxoplasmose por hemaglutinação indireta

120 testes

(Ref. 66610)

8000160-PT-2025-09_V5

Apenas para diagnóstico in vitro, apenas para uso profissional. CE 0459

1 – OBJETIVO

O dispositivo **ELI.H.A TOXO** permite a determinação semi-quantitativa de anticorpos séricos *anti-Toxoplasma gondii* por hemaglutinação indireta.
O kit permite a realização de 120 testes ou 20 reações de 6 diluições.

2 – INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii.* Benigna ou assintomática na maioria dos casos, apresenta risco grave para gestantes soronegativas, recém-nascidos e indivíduos com sistema imunológico debilitado.
Diferentes anticorpos, correspondentes à variedade de antigénios envolvidos em infeções por *Toxoplasma,* são desenvolvidos durante a resposta imune. A proporção relativa desses vários anticorpos no soro pode diferir, de um sujeito para outro, e mudar no tempo para o mesmo paciente (1,2,3,4).

3 – PRINCÍPIO

O ELI.H.A TOXO é baseado no princípio da hemaglutinação indireta. Os glóbulos vermelhos sensibilizados consistem em glóbulos vermelhos de ovelha cobertos com um antigénio de *Toxoplasma*. Esta técnica torna possível detetar IgG e IgG anti-*Toxoplasma* no soro do paciente. Estes podem ser diferenciados tratando o soro com 2-mercaptoetanol (2-ME) que inibe o poder aglutinante de IgM (2).
A presença de anticorpos séricos contra *Toxoplasma gondii* resulta na aglutinação dos glóbulos vermelhos sensibilizados, resultando num depósito vermelho/marrom turvo que reveste o poço. Na ausência de anticorpos específicos, os glóbulos vermelhos formam um depósito semelhante a um anel no fundo do poço.
Os glóbulos vermelhos não sensibilizados garantem a especificidade da reação, possibilitando eliminar qualquer interferência das aglutininas naturais anti-ovelha (heteroanticorpos Forssman, anticorpos contra mononucleose infeciosa, *etc.*).
A reação é realizada numa microplaca U.
O manuseio é simples e rápido. Os resultados estão disponíveis em 2 horas.

4 – REAGENTES E MATERIAIS

Descrição	Quantidade
R1 : frasco de 2,4 mL de glóbulos vermelhos sensibilizados	**1**
R2 : frasco de 1 mL de glóbulos vermelhos não sensibilizados	**1**
BUF : frasco de 55 mL de tampão fosfato pH 7,2	**1**
R3 : frasco de 2 mL de adsorvente	**1**
CONTROL + : frasco de 0,2 mL de controlo positivo titulado	**1**
CONTROL - : frasco de 0,2 mL de controlo negativo	**1**
MICROPLATE : microplacas com fundo em U	**2**
DROPPER : conta-gotas especial (18 ± 2 µL)	**2**

5 – PRECAUÇÕES

- Os reagentes destinam-se apenas ao uso de diagnóstico *in vitro* e devem ser manuseados por pessoal autorizado.
- Os reagentes e a microplaca podem ser utilizados até ao número de testes indicado na embalagem. Cada copo da microplaca é de uso único.
- Todos os reagentes, exceto o **BUF**, contêm matérias-primas de origem animal e devem ser manuseados com cautela.
- As amostras de pacientes são potencialmente infeciosas. Devem ser manuseadas com cautela, respeitando as regras de higiene e as normas vigentes para este tipo de produto no país de uso.
- Os reagentes contêm azida de sódio (concentração < 0.1%). A azida de sódio contida nos reagentes pode reagir com os metais pesados nos canos e formar compostos explosivos. Assim, recomenda-se não deitar os reagentes para o lavatório e seguir as recomendações e normas vigentes para a deposição de resíduos.
- Não utilizar após a data de validade.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Não use reagentes danificados ou mal conservados.
- Permita que os reagentes e as amostras retornem à temperatura ambiente antes de realizar o teste.
- Agite cuidadosamente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar: a agitação manual ou em vórtex vigoroso é obrigatória para a homogeneização dos glóbulos vermelhos. Deve-se garantir que nenhum depósito de glóbulos vermelhos permaneça no fundo do frasco.
- Ao dispensar os reagentes **R1** e **R2**, certifique-se de que o conta-gotas esteja perfeitamente vertical. Verifique a ausência de bolhas de ar nas gotas para garantir volumes de entrega constantes.

6 – COLHEITA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Use soro fresco obtido após a colheita de sangue para tubo seco (até 7 dias de armazenamento a +2°C a +8°C ou -20°C para armazenamento superior a 7 dias) e não apresente nenhum sinal de hemólise, turvação, icterícia ou contaminação. Recomenda-se que cada laboratório verifique a compatibilidade dos tubos de amostragem utilizados.
Não volte a congelar a amostra.
Não descomplique o soro.

7 – ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Todos os reagentes estão prontos para uso.
Os reagentes armazenados a +2°C a +8°C no seu estado original, são estáveis até a data de validade indicada na caixa. Não devem ser congelados.

8 – MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO

- Pipeta(s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado ao volume que será medido.
- Recipientes de resíduos contaminados
- 2-mercaptoetanol (2-ME)
- Centrífuga
- Tubos de hemólise

9 – MÉTODO

Permita que os reagentes e o soro estabilizem à temperatura ambiente antes de usar.

9.1 – Preparação de amostra

Realize uma diluição de 1/40 do soro a ser testado:

- 50 µL de soro;
- 1,95 mL de reagente **BUF**.

9.2 – Realização do teste em microplaca

- Usando uma micropipeta multicanal, adicione 50 µL de reagente **BUF** a 8 poços da microplaca.
- Usando uma micropipeta, adicione 50 µL do soro diluído ao 1º poço.
Misture o soro com o reagente **BUF** e realize uma diluição em série usando uma micropipeta transferindo 50 µL do 1º poço para o 2º, depois 50 µL do 2º para o 3º, e assim por diante até que o 6º poço seja atingido. 50 µL do 6º poço são então descartados.
Desta forma, são obtidas diluições de 1/80 a 1/2560.
- Adicionar 50 µL do soro diluído ao 7º poço.
Misture o soro com o reagente **BUF** e depois descarte 50 µL.
A diluição 1/80 é o soro controlo, cujo papel é detetar as aglutininas naturais anti-ovelha que possam estar presentes em determinadas amostras de soros.
- Agite em vórtex ou vigorosamente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.
  - Adicionar 1 gota de reagente **R1** aos primeiros 6 poços.
  - Adicione 1 gota de reagente **R2** ao 7º poço (controlo de soro).
  - Adicionar 1 gota de reagente **R1** ao 8º poço (controlo de reagente) cujo papel é controlar a validade dos reagentes **BUF** e **R1**.

Nota: Realize apenas um controlo de reagente para cada série de testes.
- Com muito cuidado, agite o conteúdo dos poços:
  - manualmente, batendo lateralmente na lateral da microplaca, até a completa homogeneização dos poços;
  - ou usando um agitador vibratório para placas de microdiluição (até 1500 rpm). Não use um agitador orbital.
- Agora deixe a placa em repouso, longe de qualquer fonte de vibração, à temperatura ambiente entre +15°C e +30°C.
- A placa pode ser lida após 2 horas. Os resultados podem ser interpretados a partir de uma reação mínima de 1h30 e até um máximo de 24 horas.

9.3 – Deteção de IgM: tratamento com 2-mercaptoetanol

A determinação de anticorpos anti-*Toxoplasma*, antes e após o tratamento do soro com 2-ME, permite a deteção de anticorpos do tipo IgM. Para testar o soro, proceda conforme explicado abaixo:
- Prepare a solução 2-ME: 140 µL de reagente 2-ME e **BUF** para fazer 10 mL. Esta solução deve ser mantida num balão castanho. É estável durante 1 mês a +2°C a +8°C.
- Misture e distribua 50 µL desta solução de 2-ME em 6 poços da microplaca.
- Em seguida, siga o protocolo de "Realização do teste em microplaca" da segunda etapa.

9.4 - Adsorção de aglutininas naturais anti-ovelha em caso de aglutinação do soro controlo

- Agite cuidadosamente o reagente **R3**.
- Num tubo, adicione e misture:
  - 0,1 mL de soro;
  - 0,3 mL de reagente R3.
- Incubar à temperatura ambiente por 60 minutos.
- Centrifugar a 800 g durante 15 minutos.
- Recolher o sobrenadante; o soro está agora numa diluição de 1/4.
- Realizar uma diluição de 1/10 do sobrenadante em reagente **BUF** para obter uma diluição de stock adsorvido (1/40).
- Repita as etapas descritas em "Realização do teste em microplaca", mas substitua a diluição do stock pela diluição do stock adsorvido.

10 – CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

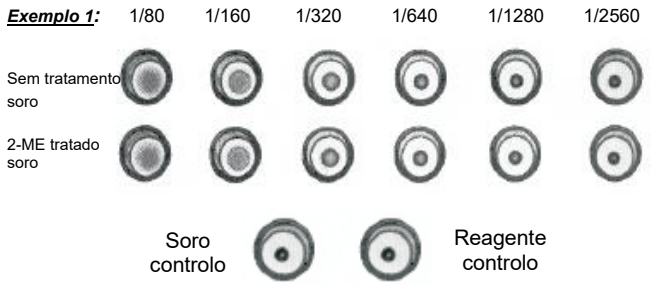
- Os reagentes de **CONTROLO+** e **CONTROLO-** devem ser tratados como soros de teste. O título do **CONTROLO+** deve ser o mesmo que o título impresso no rótulo do frasco ± uma diluição. Não deve haver nenhuma hemaglutinação do **CONTROLO-**. Se a hemaglutinação estiver presente, o teste não é válido.
- O controlo do soro deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, será necessário repetir o teste após ter eliminado as aglutininas naturais anti-ovinos do soro por adsorção.
- O controlo do reagente deve dar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, o **ELI.H.A TOXO** não pode ser usado.

11 – LEITURA

Reação negativa: **Ausência de hemaglutinação**.
Presença de um anel mais ou menos grande no fundo do poço.

Reação positiva: **Presença de hemaglutinação.**
Presença de um depósito vermelho/marrom turvo revestindo o poço; às vezes há a presença de uma borda periférica fina.

Imagens de hemaglutinação, obtidas com soro positivo, são apresentadas a seguir:



Positivo para soro 1/160. Ausência de IgM

Exemplo 2: 1/80 1/160 1/320 1/640 1/1280 1/2560

Soropositivo não tratado a 1/640 – soropositivo tratado com 2-ME a 1/80

✎ **Soro positivo. Presença de IgM**

O título é dado pela primeira diluição mostrando um anel largo e periférico.
O título em UI/mL é igual ao inverso desta diluição limite multiplicado pelo limiar de sensibilidade impresso na caixa.
Exemplo: Se um soro for positivo até a diluição 1/320, e se o limiar de sensibilidade for 0,1 UI/mL, então o título do soro será 320 x 0,1 = 32 UI/mL.

12 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Título < 1/80: Reação negativa.
Sem anticorpos anti-*Toxoplasma* ou quantidade não detetável.

- Teste de triagem: paciente provavelmente não imune, necessita acompanhamento serológico para gestantes e paciente imunocomprometido.
- Teste realizado em caso de potencial infeção aguda para um paciente imunocompetente: sem infeção por *Toxoplasma* ou infeção de início muito recente. Deve ser controlado numa 2ª amostra para detetar um possível aparecimento de anticorpos.

Tratamento com 2-mercaptoetanol (2-ME):
O tratamento do soro com 2-ME elimina a resposta IgM. Uma diminuição de pelo menos 2 diluições antes e após o tratamento com solução 2-ME do soro significa que o soro contém anticorpos IgM. Presunção de toxoplasmose aguda. Caso contrário: provavelmente infeção passada (anticorpos residuais).

1/80 ≤ Título < 1/160: Reação duvidosa.
Presença de nível limite de anticorpos anti-*Toxoplasma*. Uma possível ausência de IgM pode ser demonstrada pelo tratamento sérico com 2-ME.

- Se IgG equívoco (1/80) e IgM negativo: realizar uma técnica de confirmação de IgG de princípio diferente; recomenda-se o envio do soro para um laboratório especializado para a realização de técnicas adicionais:
  → Se o resultado de testes IgG adicionais for negativo: conclua com a ausência de anticorpos IgG; acompanhamento serológico a ser adaptado (gravidez ou paciente imunocomprometido).
  → Se o resultado de testes IgG adicionais for positivo: uma infeção antiga é provável; o resultado deve ser confirmado numa nova amostra com 3 semanas de intervalo.

Título ≥ 1/160: Reação positiva.
Presença de níveis significativos de anticorpos anti-*Toxoplasma*. O tratamento do soro com 2-ME pode ser realizado para testar a presença de IgM.

- Se IgG positivo (≥ 1/160) e IgM negativo:
  - No caso de um paciente imunocomprometido, presença de uma infeção antiga; o resultado da serologia deve ser comparado com a clínica, a biologia e o grau de imunossupressão.
  - No caso de paciente imunocompetente ou gestante, deve ser realizado teste serológico 3 semanas depois:
  → Se o título de IgG for estável: a infeção é antiga.
  → Se o título de IgG estiver aumentado: realize uma datação da infeção com um método de avidez de IgG, para poder concluir se é infeção recente ou uma possível reativação da infeção.
- Se IgG negativo e IgM positivo (≥ 1/160): neste caso, execute uma técnica de confirmação de IgM com base num princípio diferente. Se os resultados forem positivos, provavelmente é infeção recente, realize uma nova prova serológica em 2 semanas. Se os resultados forem negativos, então o IgM é inespecífico natural ou interferências, uma infeção recente não pode ser descartada, deve realizar monitorização sorológico em 2 semanas.
- Se IgG e IgM positivos (≥ 1/160):
  - No caso de um paciente imunocomprometido, os resultados da serologia terão que ser comparados com a clínica, a biologia e o grau de imunossupressão.
  - No caso de paciente imunocompetente ou gestante, realizar a datação da infeção com teste de avidez por IgG.

13 – CAUSAS DOS ERROS E LIMITES DOS TESTES

- Má preservação do soro.
- Má conservação dos reagentes após a abertura.
- Utilize apenas os conta-gotas fornecidos no kit.
- Não troque os conta-gotas entre os reagentes **R1** e **R2**.
- No caso de uma reação positiva nos primeiros 6 poços, realizar uma diluição em série adicional para determinar o limite de título de hemaglutinação.
- Alguns soros, cuja concentração de anticorpos é muito alta, podem dar origem a um fenômeno de zona (com desaparecimento da turvação) nas diluições iniciais, que desaparece nas diluições subsequentes.
- A nomenclatura francesa de atos de biologia médica especifica que 2 testes devem ser realizados simultaneamente para o diagnóstico serológico de toxoplasmose. Portanto, a interpretação global desta serologia deve ser feita de acordo com os resultados das diferentes técnicas. Em qualquer caso, o diagnóstico deve ser feito usando os resultados deste teste juntamente com os outros achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

14 – PERFORMANCES

14.1 – Sensibilidade / Especificidade / Diagnóstico

O limiar de sensibilidade do reagente, expresso em UI/mL, é indicado na caixa.
A sensibilidade das técnicas propostas para o diagnóstico serológico da toxoplasmose a cada um desses anticorpos varia de acordo com a natureza do antigénio utilizado na reação.
Além disso, o padrão internacional pode conter uma percentagem relativa de cada um dos anticorpos diferente da presente no soro a ser testado. O título expresso em UI/mL pode, portanto, variar significativamente dependendo dos métodos utilizados.
É por isso que é essencial especificar a técnica utilizada nas unidades internacionais para processar os resultados do diagnóstico.
A qualidade dos reagentes permite que a reação seja iniciada à noite e a leitura seja realizada na manhã seguinte (após um máximo de 24 horas de reação), desde que a microplaca não sofra nenhum deslocamento e esteja protegida de vibrações.
O reagente **R1** consiste em glóbulos vermelhos sensibilizados por um antigénio de *Toxoplasma* total misto, que inclui constituintes endógenos e de membrana do *Toxoplasma*, garante sensibilidade e especificidade à reação.
Os resultados de sensibilidade e especificidade foram sintetizados com base em dois estudos (5,6). Um primeiro estudo compreendendo 1710 soros positivos para IgG/IgM *anti-Toxoplasma* e 1290 soros negativos (5), e um segundo estudo compreendendo 342 soros positivos para IgG/IgM *anti-Toxoplasma* e 247 soros negativos (6), foram analisados usando o modelo Meta Analysis (pacote "meta") do software R (https://www.r-project.org/).
Assim, os resultados desta meta-análise mostram uma sensibilidade diagnóstica de 99% IC 95% [99%-99%] e uma especificidade diagnóstica de 98% IC 95% [96%-99%]. Os Valores Preditivos Positivos (VPP) estão entre 98,3% e 99,5% e os Valores Preditivos Negativos (VPN) estão entre 98% e 98,8%.

14.2 – Limite de quantificação

O limite de quantificação do teste de ELI.H.A TOXO é definido pelo limiar de sensibilidade e corresponde à diluição do primeiro poço do teste. O seu valor é igual ao inverso desta diluição multiplicado pelo limiar de sensibilidade.

14.3 – Repetibilidade

Em soros positivos com títulos superiores a 16 UI/mL, o dispositivo ELI.H.A TOXO tem 100% de repetibilidade com uma tolerância aceitável de +/- uma diluição.
Em soros negativos, estritamente abaixo de 8 UI/mL, o dispositivo ELI.H.A TOXO tem 100% de repetibilidade sem tolerância de positividade no resultado.

14.4 – Reprodutibilidade

Em soros positivos com títulos superiores a 16 UI/mL, o dispositivo ELI.H.A TOXO tem 100% de reprodutibilidade com uma tolerância aceitável de +/- uma diluição.
Em soros negativos estritamente abaixo de 8 UI/mL, o dispositivo ELI.H.A TOXO tem 100% de reprodutibilidade sem tolerância de positividade no resultado.

14.5 – Interferência

Reações cruzadas foram observadas com amostras positivas de anticorpo anti-nuclear ou anticorpo anti-sífilis.
Não foram observadas reações cruzadas com anticorpos de esclerodermia, HA IgM (hepatite A), CMV IgM (citomegalovírus) ou amostras positivas de anticorpos de Lyme (6).
As potenciais interferências com hemoglobina, lípidos e bilirrubina foram estudadas de acordo com as recomendações do CLSI EP07 (7,8,9,10,11).
Nenhuma interferência significativa foi detetada até as seguintes concentrações máximas:

Substância em estudo	Concentrações de pico
Bilirrubina	800 mg/L
Lípidos	15 g/L
Hemoglobina	10 g/L

14.6 – Linearidade / Exatidão

O teste de ELI.H.A TOXO possibilita a obtenção de resultados de titulação diretamente proporcionais à quantidade de analito (anticorpo Anti-*Toxoplasma gondii*) presente na amostra, na faixa de medição de 8 a 256 UI/mL.
O viés de precisão do método ELI.H.A TOXO é:

Soro < 8 UI/mL:	0%
Soro para 10,4 UI/mL:	15,38%
Soro para 213,5 UI/mL:	-10,07%

15 – ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Os resíduos devem ser eliminados de acordo com as regras de higiene e regulamentos vigentes para este tipo de produto no país de uso.
Se o reagente **BUF** for derramado, limpe a área de trabalho com papel absorvente e enxague com água. Se um soro ou outro reagente for derramado, limpe com alvejante e papel absorvente.

16 – BIBLIOGRAFIA

1. Société Française de Microbiologie Toxoplasmose. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2022 : p.1011 - 1022
2. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Technique d'agglutination. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p169 -172
3. Association française des enseignants de parasitologie et mycologie Toxoplasmose. In : Parasitologie et mycologie médicales ELSEVIER Ed ; 2022 : p279 – 288
4. Rapport HAS – Février 2017 – Diagnostic biologique de la toxoplasmose acquise du sujet immunocompétent (dont la femme enceinte), la toxoplasmose congénitale (diagnostic pré- et postnatal) et la toxoplasmose oculaire EVALUATION DES TECHNOLOGIES DE SANTÉ - Mis en ligne le 13 févr. 2017 https://www.has-sante.fr/jcms/c_2653655/fr/diagnostic-biologique-de-la-toxoplasmose-acquise-du-sujet-immunocompetent-dont-la-femme-enceinte-la-toxoplasmose-congenitale-diagnostic-pre-et-postnatal-et-la-toxoplasmose-oculaire
5. J.-C. Fourlinnie R. Guffroy, J.-C. Herbaut, et al. Optmisation du dépistage des anticorps antitoxoplasmiques IgG et IgM par l'association d'une réaction d'hemagglutination indirecte et d'un test au latex standardisé sur plaque de kine, Feuillets de biologie, 1985-Vol.XXVI-N146
6. Villard O, Cimon B, Franck J, et al. Evaluation of the usefulness of six commercial agglutination assays for serologic diagnosis of toxoplasmosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(3):231-235.
7. Lo SY, Saifee NH, Mason BO, Greene DN. Filling in the gaps with non-standard body fluids. Pract Lab Med. 2016 Mar 16;5:24-31. doi: 10.1016/j.plabm.2016.03.003. PMID: 28856201; PMCID: PMC5574517.
8. CLSI.Interference Testing in Clinical Chemistry.3rd ed. CLSI guideline EP07. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p23-24
9. CLSI.Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry.1st ed. CLSI supplement EP37. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. p94-96
10. Hyperbilirubinémie néonatale - Pédiatrie - Édition professionnelle du Manuel MSD § Etiologie de l'hyperbilirubinémie néonatale p5 (msdmanuals.com)
11. Bilirubine - Normes biologiques - Cours IFSI - Fiche IDE §Présence d'ictère p3 (fiches-ide.fr)

Qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo deve ser notificado ao fabricante e à Autoridade Competente do Estado-Membro em que o utilizador está estabelecido.

O Resumo de Segurança e Desempenho (SSP) será disponibilizado através da base de dados europeia EUDAMED assim que estiver totalmente operacional: https://ec.europa.eu/tools/eudamed

As alteraçoes em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.

ELITech MICROBIO
Parc d 'activités du Plateau
Allée d'Athènes 83870 SIGNES
FRANCE
☎: +33 (0)4 94 88 55 00
http://www.elitechgroup.com