

ELI.H.A Toxo

Serodiagnostik der Toxoplasmose durch indirekte hämagglutination

120 Tests
(Art. 66610)



8000160-DE-2012-02

Zur *in-vitro*-Diagnostik, für den professionellen Einsatz.
Die Tests sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

1 - ZIEL

ELI.H.A Toxo ermöglicht die quantitative Bestimmung von Serumantikörpern gerichtet gegen *Toxoplasma gondii* durch indirekte hämagglutination. Das Kit ermöglicht die Durchführung von 120 Tests oder 20 Reaktionen mit 6 Verdünnungen.

2 - EINFÜHRUNG

Toxoplasmose ist eine parasitäre Infektion, deren Erreger das Protozoen *Toxoplasma gondii* ist. Gutartig oder in den allermeisten Fällen sogar asymptomatisch, stellt dies nur für seronegative Schwangere und Patienten mit einem schwachen Immunsystem ein ernstes Risiko dar. Während der Immunantwort entwickelt das Individuum verschiedene Arten von Antikörpern, die gegen verschiedene toxoplasmatische Antigene gerichtet sind. Der relative Prozentsatz jedes dieser Antikörper im Serum kann von einem Subjekt zum anderen und innerhalb desselben Subjekts je nach Entwicklungsstadium der Infektion variieren.

3 - GRUNDSATZ

ELI.H.A Toxo basiert auf dem Prinzip der indirekten hämagglutination. Die sensibilisierten roten Blutkörperchen bestehen aus roten Blutkörperchen von Schafen, die mit einem toxoplasmatischen Antigen bedeckt sind. Diese Technik wird zum Nachweis von antitoxoplasmatischem IgG und IgM eingesetzt. Sie lassen sich durch die Behandlung des Serums mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) unterscheiden, das die Bindungskraft von IgM hemmt. Das Vorhandensein von Anti-*Toxoplasma gondii* -Antikörpern im Serum führt zur Agglutination von sensibilisierten roten Blutkörperchen, was zu einem rotbraunen Schleier im Brunnen führt. In Abwesenheit spezifischer Antikörper sedimentieren diese roten Blutkörperchen am Boden des Brunnens in Form eines Ringes. Die nicht sensibilisierten roten Blutkörperchen gewährleisten die Spezifität der Reaktion und eliminieren Störungen durch natürliche Anti-Schaf-Agglutinine (Forssmans hetero-Antikörper, Antikörper gegen infektiöse Mononukleose, usw.). Die Reaktion findet in einer U-förmigen Mikrotiterplatte statt. Die Handhabung ist einfach und schnell. Die Ergebnisse werden in 2 h erzielt.

4 - REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Beschreibung	Anzahl
R1 : Behälter mit 2,4 mL sensibilisierten roten Blutkörperchen	1
R2 : Behälter mit 1 mL nicht sensibilisierten roten Blutkörperchen	1
BUF : Behälter mit 55 mL Puffer Phosphat pH 7,2	1
R3 : Behälter mit 2 mL Adsorptionsmittel	1
CONTROL + : Behälter mit 0,2 mL getiterter Positivkontrolle	1
CONTROL - : Behälter mit 0,2 mL Negativkontrolle	1
MIKROPLATTE : U-förmige Mikroplatten	2
DROPPER : spezieller Tropfer (18 ± 2 µL)	2

5 - VORSICHTSMAßNAHMEN FÜR DEN GEBRAUCH

- Reagenzien sind nur für die *in vitro*-Diagnose bestimmt und müssen von autorisiertem Personal behandelt werden.
- Die Tests sind nur für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

- Alle Reagenzien, außer **BUF**, enthalten Substanzen tierischen Ursprungs und müssen mit Vorsicht behandelt werden.
- Die Proben sind potentiell infektiös. Sie müssen mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen und unter Beachtung der im Verwendungsland geltenden Hygienevorschriften behandelt werden.
- Die Behälter **CONTROL** enthalten Natriumazid (<0,1 %).
- Verwenden Sie keine Reagenzien über das Verfallsdatum hinaus.
- Verwenden Sie keine Reagenzien aus verschiedenen Chargen.
- Warten Sie, bis sich das Serum und die Reagenzien bei Raumtemperatur ausgeglichen haben, bevor Sie den Test durchführen.
- Reagenzien **R1** und **R2** vor Gebrauch sorgfältig schütteln.
- Bei der Dosierung der Reagenzien **R1** und **R2** ist darauf zu achten, dass der Tropfer senkrecht steht. Stellen Sie sicher, dass sich keine Luftblasen in den Tropfen befinden, damit die Fördermenge konstant bleibt.

6 - PROBENAHME UND -VERARBEITUNG

Verwenden Sie frische Seren oder Seren, die bei -20°C gelagert werden und frei von Hämolyse, Trübung oder Verunreinigung sind. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Das Serum nicht zersetzen.

7 - KONSERVIERUNG UND HERSTELLUNG VON REAGENZIEN

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen sind alle bei 2-8°C gelagerten Reagenzien bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil. Sie dürfen nicht eingefroren werden.

8 - BENÖTIGTES, ABER NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENES MATERIAL

- Automatische Pipette(n) mit an die zu messende Menge angepasstem Pipettiervolumen
- Behälter für kontaminierte Abfälle
- 2-mercaptoethanol (2-ME)
- Zentrifuge
- Hämolyse-Röhrchen.

9 - VORGEHENSWEISE

Lassen Sie die Reagenzien vor Gebrauch bei Raumtemperatur ausgleichen.

9.1 - Vorbereitung der Probe

Verdünnen Sie das zu testende Serum auf 1/40:

- 50 µL Serum;
- 1,95 mL Reagenz **BUF**.

9.2 - Durchführung des Mikrotiterplatten-Tests

- Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 50 µL Reagenz **BUF** in 8 Brunnen der Mikrotiterplatte.
- Geben Sie mit einer Mikropipette 50 µL des verdünnten Serums in den 1. Brunnen. Mit dem Reagenz **BUF** mischen und 50 µL aus dem 1. Brunnen in den 2. pipettieren, vom 2. in den 3., und so weiter bis zum 6. Brunnen, wobei 50 µL vom 6. Brunnen entsorgt werden. Daraus ergeben sich Verdünnungen von 1/80 bis 1/2560.
- Geben Sie 50 µL des verdünnten Serums in den 7. Brunnen. Mit Reagenz **BUF** mischen und 50 µL entsorgen. Diese Verdünnung (1/80) stellt die Serumkontrolle dar, deren Aufgabe es ist, die natürlichen Anti-Schaf-Agglutinine nachzuweisen, die bestimmte Seren enthalten können.
- Die Reagenzien **R1** und **R2** vorsichtig schütteln.
 - Geben Sie 1 Tropfen Reagenz **R1** in die ersten 6 Brunnen.
 - Geben Sie 1 Tropfen Reagenz **R2** in den 7. Brunnen (Serumkontrolle).
 - Geben Sie 1 Tropfen Reagenz **R1** in den 8. Brunnen (Reagenzienkontrolle), dessen Aufgabe es ist, die Gültigkeit des Reagenzes **BUF** und des Reagenzes **R1** zu kontrollieren.

hinweis: Führen Sie pro Testlauf nur eine reaktive Steuerung durch.
- homogenisieren Sie den Inhalt der Brunnen sehr sorgfältig:

- entweder manuell, indem Sie die Seiten der Mikroplatte flach auf die Seiten klopfen;
- oder mittels Rührwerk für Mikrotiterplatten. Verwenden Sie kein Orbitalrührwerk.

- Lassen Sie die Platte dann ruhig und vibrationsfrei stehen.
- Lesen Sie die Reaktion 2 h später ab.

9.3 - IgM-Nachweis: 2-Mercaptoethanol-Behandlung

Die Bestimmung von antitoxoplasmatischen Antikörpern vor und nach der Behandlung des Serums mit 2-ME ermöglicht es, das Vorhandensein von IgM-Antikörpern hervorzuheben.
- Stellen Sie die 2-ME-Lösung her: 140 µL 2-ME qsp 10 mL mit Reagenz **BUF**. Diese Lösung sollte in einer braunen Flasche aufbewahrt werden. Sie ist 1 Monat lang bei +2°. +8°C stabil.
- Schütteln und dosieren Sie 50 µL dieser 2-ME-Lösung in 6 Brunnen der Mikrotiterplatte.
- Dann folgen Sie ab dem zweiten Schritt dem Protokoll "Durchführung des Mikrotiterplatten-Tests".

9.4 - Adsorption von natürlichen Anti-Schafagglutininen bei Serumkontrollagglutination

- Schütteln Sie das Reagenz **R3** vorsichtig.
- Geben Sie es in ein Röhrchen und mischen Sie:
 - 0,1 mL Serum;
 - 0,3 mL Reagenz **R3**.
- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- 15 Minuten lang bei 800 g zentrifugieren.
- Den Überstand einsammeln; das Serum wird dann auf 1/4 verdünnt.
- Den Überstand auf 1/10 in Reagenz **BUF** verdünnen, um eine adsorbierte Stoffverdünnung (1/40) zu erhalten.
- Wiederholen Sie das Protokoll "Durchführung des Tests auf Mikroplatte" und ersetzen Sie die Mutterverdünnung durch die adsorbierte Mutterverdünnung.

10 - INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Die Reagenzien **CONTROL+** und **CONTROL-** sollten zur Analyse als Seren behandelt werden. Der Titel von **CONTROL+** muss dem auf dem Flaschenetikett angegebenen Titel bei ± einer Verdünnung entsprechen. Das **CONTROL-** darf keine hämagglutination haben. Ist dies nicht der Fall, ist der Test nicht gültig.
- Die Serumkontrolle sollte eine negative Reaktion (Ring) auslösen. Im Falle einer hämagglutination dieser Kontrolle ist es notwendig, den Test zu wiederholen, nachdem die natürlichen Anti-Schaf-Agglutinine durch Adsorption aus dem Serum entfernt wurden.
- Die reaktive Kontrolle muss eine negative Reaktion (Ring) auslösen. Ist diese Kontrolle hämagglutiniert, kann das Produkt **ELI.H.A Toxo** nicht verwendet werden.

11 - ABLESEN

Negative Reaktion:

Abwesenheit von hämagglutination.

Vorhandensein eines mehr oder weniger breiten Ringes am Boden des Brunnens.

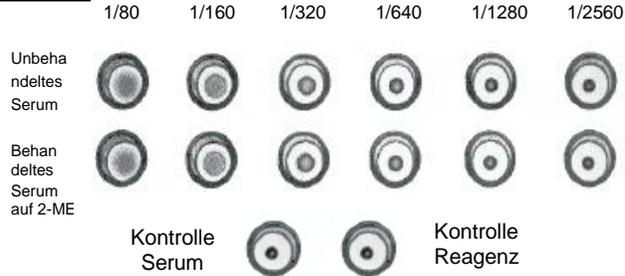
Positive Reaktion:

Anwesenheit von hämagglutination.

Vorhandensein eines rot/braunen Schleiers, der den Brunnen auskleidet; manchmal mit einem dünnen Rand.

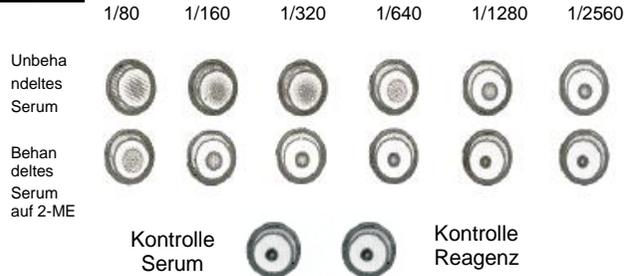
Reaktive Bilder der hämagglutination, die mit positiven Seren gewonnen wurden, sind unten dargestellt.

Beispiel 1:



↳ 1/160 Serum positiv ohne IgM

Beispiel 2:



1/640 positives unbehandeltes Serum - 1/80 positives 2-ME-Serum
↳ positives Serum, das IgM enthält

Der Titer wird durch die erste Verdünnung gegeben, die einen breiten und peripheren Ring aufweist.

Der **UI/mL-Titer** entspricht dem Kehrwert dieser Grenzverdünnung multipliziert mit der Empfindlichkeitsschwelle des auf dem Kit angegebenen Reagenzes.

Beispiel: Wenn ein Serum bis zu einer Verdünnung von 1/320 positiv ist und die Empfindlichkeitsschwelle bei 0,1 IU / ml liegt, beträgt der Titer dieses Serums $320 \times 0,1 = 32 \text{ IU / ml}$.

12 - INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Titer < 1/80 : Negative Reaktion.

Fehlen von Anti-Toxoplasma-Antikörpern oder nicht nachweisbarem Niveau.

• **Screening-Untersuchung:** Fehlen einer wahrscheinlichen Immunität, die im Falle einer Schwangerschaft einer serologischen Überwachung bedarf.

• **Untersuchung bei Verdacht** auf eine toxoplasmatische Infektion:

Fehlen einer toxoplasmatischen Infektion oder einer sehr frühen Infektion.

Mit einer neuen Probe zu überprüfen, um das mögliche Auftreten von Antikörpern hervorzuheben.

1/80 ≤ Titer < 1/160: Positive Reaktion.

Vorhandensein von Anti-Toxoplasma-Limit-Antikörpern.

• **Screening untersuchung:** nach den Ergebnissen aller auf das Serum angewendeten toxoplasmatischen Serologietechniken zu interpretieren. Gegebenenfalls an einer neuen Probe zu prüfen.

• **Nachuntersuchung einer schwangeren** Frau, von der bekannt ist, dass sie nicht immun ist, oder Untersuchung bei Verdacht auf eine neue Infektion: wahrscheinlich aktive Toxoplasmose. Ein IgM-Test sollte durchgeführt werden.

Titer ≥ 1/160: Positive Reaktion.

Anti-Toxoplasma-Antikörper vorhanden.

• **Screening-Test:** Wahrscheinliche vergangene Immunität (Restantikörper).

• **Nachuntersuchung einer schwangeren Frau, von der bekannt ist, dass sie nicht immun ist, oder Untersuchung bei Verdacht auf eine neue Infektion:** wahrscheinlich aktive Toxoplasmose.

Es wird empfohlen, das Serum mit 2-ME zu behandeln, um nach dem Vorhandensein von IgM zu suchen und eine Kontrolle mit einer neuen Probe durchzuführen.

Behandlung mit 2-ME:

Eine Titerabnahme von mindestens 2 Serumverdünnungen vor und nach der 2-ME-Behandlung deutet auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern hin. Vermutung einer fortschreitenden Toxoplasmose.

Ansonsten: Wahrscheinliche frühere Immunität (Restantikörper).

13 - FEHLERURSACHEN UND EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS

- Falsche Aufbewahrung des Serums.

- Falsche Aufbewahrung der Reagenzien nach dem Öffnen.

- Nutzen Sie ausschließlich den im Kit enthaltenen Tropfer.

- Tauschen Sie die Tropfer der Reagenzien **R1** et **R2** nicht.

- Im Falle einer positiven Reaktion in den ersten 6 Brunnen setzen Sie die Verdünnungen für die Suche nach dem grenzwertigen Hämagglutinationstiter fort.

- Einige Seren, deren Antikörperkonzentration sehr hoch ist, kann ein Zonenphänomen hervorrufen (mit Rückzug des Schleiers) in den ersten Verdünnungen, die in den nachfolgenden Verdünnungen verschwinden.

- Die französische Nomenklatur der medizinischen Biologie schreibt folgendes vor 2 tests müssen für die serologische Diagnose von Toxoplasmose gleichzeitig durchgeführt werden. Die Gesamtinterpretation dieser Serologie sollte daher nach den Ergebnissen der verschiedenen Techniken hergestellt werden. In allen Fällen ist es notwendig, alle klinischen, epidemiologischen und biologischen Daten zu integrieren, bevor die endgültige Diagnose gestellt wird.

14 - LEISTUNG

Die Empfindlichkeitsschwelle des Reagenzes, ausgedrückt in IU/mL, wird auf dem Kit angezeigt. Die Empfindlichkeit der vorgeschlagenen Techniken für die Toxoplasmoseprüfung auf jeden dieser Antikörper hängt von der Art des in der Reaktion verwendeten Antigens ab.

Darüber hinaus kann der internationale Standard einen relativen Prozentsatz jedes Antikörpers enthalten, der sich von dem des zu testenden Serums unterscheidet.

Der in IU/mL ausgedrückte Titer kann daher je nach verwendeter Methode stark variieren.

Deshalb ist es wichtig, die Technik zu spezifizieren, mit der die Ergebnisse der Diagnose in internationalen Einheiten dargestellt werden.

Die Qualität der Reagenzien ermöglicht die Reaktion am Abend und die Messung am nächsten Morgen, sofern die Mikrotiterplatte nicht verschoben und vor Vibrationen geschützt wird.

Das Reagenz **R1** besteht aus roten Blutkörperchen, die mit einem gemischten Gesamttoxoplasma-Antigen sensibilisiert sind, das sowohl endogene als auch membranständige Bestandteile des Toxoplasmas enthält. Es stellt die Sensitivität und Spezifität der Reaktion sicher.

So zeigen die Ergebnisse der Testauswertungen eine Sensitivität von 99,2 % und eine Spezifität von 97,7 %.

Wenn dieses Reagenz mit **ELITex Toxo** assoziiert ist, wird eine Korrelation von 98,2 (18) bis 99,8 % (17) in Abhängigkeit von der verwendeten Referenztechnik erreicht.

Bei der "Neubewertung von 40 Reagenzienkits zum Nachweis von Antitoxoplasmose IgG Antikörpern" durch die Agence du Médicament im März 1998 (19) wurden 40 verschiedene Seren mit dem **ELI.H.A Toxo**:

- 9 negative Seren ergaben negative Ergebnisse

- Bei 7 Seren wurde keine negative Reaktion festgestellt
grenzwertig positiv getestet

- 24 positive Seren wurden als solche identifiziert

15 - ABFALLENTSORGUNG

Abfälle müssen gemäß den für diese Art von Produkten im Land geltenden Hygienevorschriften und -bestimmungen entsorgt werden.

Wenn BUF-Reagenz versehentlich verschüttet wird, reinigen Sie die Arbeitsfläche mit saugfähigem Papier und spülen Sie sie mit Wasser ab. Wenn Serum oder andere Reagenzien verschüttet werden, mit Bleichmittel und Papiertüchern reinigen.

16- LITERATURVERZEICHNIS

1. P. WATTRE, R. BRULE, A. CAPRON, J. SAMAILLE et J. FRUIT - Analyse antigénique de *Toxoplasma gondii* et diagnostic immunologique de la toxoplasmose humaine - *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 1969, XX, 167-182.
2. P. AMBROISE-THOMAS - La toxoplasmose - *Cahiers Médicaux Lyonnais*, 1972, 48.
3. P. AMBROISE-THOMAS - La détection des anticorps IgG et IgM dans le diagnostic de la toxoplasmose acquise et la prévention de la toxoplasmose congénitale - *Bull. Soc. Pathol. hum. et comp.*, 1972, 4, 211.
4. G. ETCHARRY, F. ETCHARRY-LAPEYRE, J. TRIBOULEY, A. CAPBERN et R. PAUTRIZEL - Intérêt d'une réaction d'hémagglutination passive pour le diagnostic de la toxoplasmose - *Ann. Biol. Clin.*, 1973, 31, 439-446.
5. CAPRON, P. WATTRE, A. VERNES et G. DELAUNOY - Le diagnostic immunologique de la toxoplasmose - *Lille Médical*, 1974, 19, 2, 147-150.
6. CAPRON, A. VERNES, P. WATTRE, M. DELECOUR, J.-C. MONNIER, J.-L. LEROY, M.-F. DEVARENNE, S. MONARD, G. TAJCHNER, G. DURIEUX et MENDOLIA - La toxoplasmose en milieu obstétrical - *Lille Médical*, 1974, 19, 6, 646-650.
7. J.-M. SENET et R. ROBERT - Hémagglutination indirecte utilisant un antigène particulaire. appliquée au diagnostic immunologique de la toxoplasmose - *Med. et Mal. Inf.*, 1974, 4, 1, 21-22.
8. P. AMBROISE-THOMAS - L'immuno-fluorescence aux anti-IgM marquées dans le diagnostic précoce de la toxoplasmose acquise ou congénitale. Bilan de 24.000 examens. - *Fondation Mérieux Edit., Lyon*, 1975.
9. G. DESMONTS - Séro-diagnostic de la toxoplasmose. Intérêt et limites des différentes méthodes. Leur application au diagnostic de la toxoplasmose acquise - *Feuillets de Biologie*, 1975, 16, 61, final.
10. P. WATTRE, J.-C. DUGIMONT, M. CAPRON et A. CAPRON - Evaluation des méthodes d'hémagglutination indirecte dans les toxoplasmoses humaines et expérimentales - *Fondation Mérieux Edit., Lyon*, 1975, 49-59.
11. M.-E. CAMARGO, P.-G. LESER et W.-S.-P. LEGER - Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. I. A comparative study of hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests in 3.752 serum samples - *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1976, 18.
12. M.-E. CAMARGO et P.-G. LESER - Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II. Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests - *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 1976, 18, 227.
13. J.-M. SENET, R. ROBERT et G. MAURAS - Diagnostic de la toxoplasmose par hémagglutination indirecte. I. Etude comparative de la fixation par le glutaraldéhyde sur des globules rouges formolés d'un antigène endogène soluble, d'un antigène particulaire insoluble et d'un antigène total - *Biomédecine*, 1976, 25, 191.
14. J.-M. SENET, R. ROBERT et G. MAURAS - Diagnostic de la toxoplasmose par hémagglutination indirecte. II. Intérêt de la fixation de l'antigène total mixte en présence de glutaraldéhyde dans le diagnostic précoce de l'affection - *Biomédecine*, 1976, 25, 212.
15. P. AMBROISE-THOMAS, J. SIMON et M. RAYARD - L'hémagglutination indirecte avec antigène total mixte, dans le contrôle de l'immunité antitoxoplasmique et le séro-diagnostic de la toxoplasmose humaine. Comparaison à l'immuno-fluorescence - *Biomédecine*, 1978, 29, 245-248.
16. J.-M. SENET et R. ROBERT - Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmose et à l'aspergillose - *Arch. Med. de l'Ouest*, 1979, 11, 1, 39-42.
17. J.-C. FOURLANNIE, R. GUFFROY, J.-C. HERBAUT et A. LABARTHE - Optimisation du dépistage des anticorps antitoxoplasmiques IgG et IgM par l'association d'une réaction d'hémagglutination indirecte et d'un test au latex standardisé sur plaque de Kline - *Feuillets de Biologie*, 1985, Vol. XXVI, N°146, 47-49.
18. P. LE PAPE, U. MUNOZ, M.-L. TROMEUR et M. MARJOLET - Association d'un test au latex et d'une réaction d'hémagglutination indirecte pour le dépistage de la toxoplasmose: étude sérologique et enquête dans le secteur privé - *Feuillets de Biologie*, 1996, Vol. XXXVII, N°210.
19. J.-C. PETITHORY, M. MILGRAM, C. JANOT, P. MAISONNEUVE, M.-L. MIGUERES, N. CHARLIER, M. FROMAGE, F. BERTHELOT et A. LEBLANC - Réévaluation de 40 trousseaux de réactifs pour la détection des anticorps anti-toxoplasmose de type IgG - *Revue française des laboratoires*, mars 1998, N° 301.

Die Änderungen seit der letzten Revision sind grau hinterlegt.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎ : 33 (0)4 94 88 55 00
Fax : 33 (0)4 94 32 82 61
<http://www.elitechgroup.com>

