

ELI.H.A Toxo

Sierodiagnosi della toxoplasmosi tramite emoagglutinazione indiretta

120 Tests
(Art. 66610)

8000160-IT-2012-02

Per uso diagnostico in vitro, solo per uso professionale.



1 - SCOPO

ELI.H.A Toxo consente la determinazione quantitativa degli anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* in campioni di siero tramite emoagglutinazione indiretta. Ogni kit consente 120 test da effettuare o 20 reazioni di 6 diluizioni.

2 - INTRODUZIONE

La toxoplasmosi è un'infezione parassitaria il cui agente è il protozoo *Toxoplasma gondii*. Benigna, anche asintomatica nella stragrande maggioranza dei casi, presenta solo un serio rischio per donne in gravidanza HIV-negative e soggetti con HIV difesa immunitaria indebolita.

Durante la risposta immunitaria, l'individuo sviluppa diversi tipi anticorpi, diretti contro diversi antigeni toxoplasmatici. La percentuale relativa di ciascuno di questi anticorpi nel siero può variare da un soggetto all'altro, e, nello stesso soggetto, secondo lo stadio di evoluzione di l'infezione.

3 - PRINCIPIO

ELI.H.A Toxo si basa su emoagglutinazione indiretta. Eritrociti sensibilizzati sono composti di eritrociti di pecora rivestiti con un antigene *Toxoplasma gondii*. Anticorpi IgM e IgG vengono rilevati da questa tecnica. Essi possono essere differenziati trattando siero con 2-mercaptoetanolo (2-ME), che inibisce la potenza agglutinanti di IgM.

La presenza degli anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* in campioni di siero è rivelata da un'agglutinazione dei eritrociti sensibilizzati : una pellicola rossiccia-marrone nel pozzo. In assenza degli anticorpi specifici, questi eritrociti si depositano e formano un anello sul fondo del pozzetto.

Eritrociti non sensibilizzati, assicura la specificità della reazione e permette l'eliminazione di interferenze dovute alle agglutinine anti-pecora naturali (eteroanticorpi di Forssman, anticorpi della mononucleosi infettiva...).

La reazione viene effettuata in micropietra a U. L'esecuzione del test è semplice e rapida . I risultati si ottengono in 2 ore.

4 - CONTENUTO DELLA CONFEZIONE

Descrizione	Quantità
R1 : Fiala di 2,4 mL dei eritrociti sensibilizzati	1
R2 : Fiala di 1 mL dei eritrociti non sensibilizzati	1
BUF : Fiala di 55 mL di soluzione tampone fosfato pH 7,2	1
R3 : Fiala di 2 mL di sostanza assorbente	1
CONTROL + : Fiala di 0,2 mL di controllo positivo titolato	1
CONTROL - : Fiala di 0,2 mL di controllo negativo	1
MIKROPLATTE : Micropietre a U	2
DROPPER : Contagocce speciali (18 ± 2 µL)	2

5 - AVVERTIMENTI E PRECAUZIONI

- Solo per uso diagnostico in vitro, solo per uso professionale.
- I test sono intesi per uso singolo.
- Tutti i reagenti, eccetto di reagente **BUF**, contengono materiale di origine animale. Conseguentemente, devono essere manipolati come componenti pericolosi

- I campioni sono potenzialmente infettivi. Devono essere maneggiati con le consuete precauzioni, nel rispetto delle norme igieniche e le normative vigenti nel paese di utilizzo.
- Le fiale **CONTROL** contengono sodio azide (con una contrazione inferiore allo 0,1% p/p).
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Non scambiare reagenti e controlli provenienti da lotti diversi.
- Lasciare tornare a temperatura ambiente i reagenti e i campioni prima di effettuare il test.
- Agitare con cautela i reagenti **R1** e **R2** prima dell'uso.
- Quando si versano i reagenti **R1** e **R2**, accertarsi che l'ago del contagocce sia perfettamente verticale. Verificare che non vi siano bolle d'aria nelle gocce per assicurare volumi di erogazione costanti.

6 - PRELIEVO/PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Utilizzare sieri freschi o sieri conservati a -20°C. Non usare siero emolizzato, torbido o contaminato. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non decomplicare il siero.

7 - MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti sono pronti per l'uso. Conservare a +2 - 8°C, fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Non congelare.

8 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Pipetta/e automatica/e con volume di pipettaggio adattato alla quantità da misurare
- Contenitore per rifiuti contaminate
- 2-mercaptoetanolo (2-ME)
- Centrifuga
- Tubi per emolisi

9 - ESECUZIONE DEL TEST

Prima dell'uso, lasciare che i reagenti e i campioni tornino a temperatura ambiente.

9.1 - Preparazione di diluizione stock 1/40 di siero test

Diluire il siero da testare a 1/40:
- 50 µL di siero;
- 1,95 mL di reagente **BUF**.

9.2 - Esecuzione del test su micropietra

- Tramite una micropipetta multicanale, versare 50 µL di reagente **BUF** in 8 pozzetti della micropietra.
- Tramite una micropipetta, aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nel primo pozzetto. Mescolare con il reagente **BUF** e trasferire, preferibilmente tramite un microdiluitore, 50 µL dal primo pozzetto nel secondo pozzetto, dal secondo pozzetto al terzo, e così via fino al sesto pozzetto. Scartare 50 µL dal sesto pozzetto. Otteniamo così le diluizioni da 1/80 fino a 1/2560.
- Aggiungere 50 µL di diluizione stock di siero nell'settimo pozzetto. Miscelare con il reagente **BUF** e scartare 50 µL. Questa diluizione 1/80 costituisce il controllo del siero e serve per il rilevamento di agglutinine anti-pecora naturali, che possono verificarsi in alcuni sieri.
- Agitare con cautela le reagenti **R1** e **R2**.
 - Distribuire una goccia di reagente **R1** nei primi sei pozzetti.
 - Distribuire una goccia di reagente **R2** nella settima pozzetto (controllo del siero).
 - Distribuire una goccia di reagente **R1** in otava pozzetto (controllo del reagente). La sua funzione è quella di controllare la validità del reagente **BUF** e del reagente **R1**.

Nota : Predisporre solo un controllo del reagente per serie di saggi.
- Con molta cautela, omogeneizzare il contenuto dei pozzetti :
• Manualmente, dando leggeri colpi ai lati della micropietra, posizionata di piatto
• O con un vibratore-agitatore per micropietre (ad esempio 1300 giri/min per 10 secondi). Non utilizzare agitatore orbitale.

- Poi lasciare ferma la piastra, lontano da vibrazioni.
- Leggere la reazione due ore dopo.

9.3 - Rilevazione dei IgM: trattamento con 2-mercaptoetanolo

Determinazione degli anticorpi anti-*Toxoplasma*, prima e dopo il trattamento di siero con 2-ME, permette di evidenziare la presenza di anticorpi di tipo IgM. Per testare il siero, procedere come spiegato di seguito :
- Preparazione della soluzione di 2-ME : 140 µL di 2-ME e reagente **BUF** per fare 10 mL. Questa soluzione deve essere conservata in un fiale marrone per 1 mese a +2 ° ... +8 ° C.
- Mescolare e consegnare 50 µL di questa soluzione 2-ME in 6 pozzetti della micropietra.
- Poi seguire il protocollo di "Esecuzione del test su micropietra" dalla seconda fase.

9.4 - Assorbimento delle agglutinine anti-pecora naturali in caso di agglutinazione del controllo del siero

- Agitare con cautela il reagente **R3**.
- Introdurre in un tubo e mescolare :
- 0,1 mL di siero test ;
- 0,3 mL di reagente **R3**.
- Incubare per 60 min a temperatura ambiente.
- Centrifugare a 2000 giri/min per 15 min.
- Raccogliere il fluido supernatante ; il siero quindi è diluito 1/4.
- Diluire il fluido supernatante 1/10 con il reagente **BUF** per ottenere una soluzione stock adsorbita (1/40).
- Seguire il protocollo di "Esecuzione del test su micropietra" sostituendo la diluizione stock con la soluzione stock adsorbita.

10 - CONTROLLO DELLA QUALITÀ INTERNO

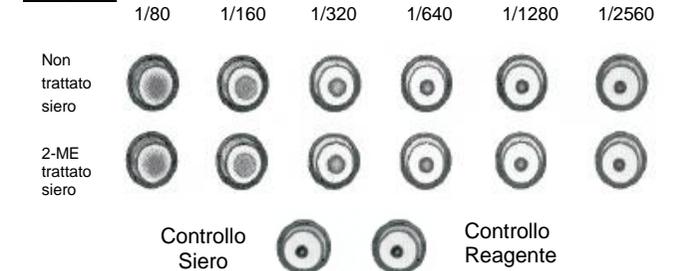
Ogni kit include **CONTROL -** e **CONTROL +** titolati, pronti all'uso e da eseguire come i campioni. Questi controlli convalidano il test. Il titolo del **CONTROL +** deve essere pari a ± una diluizione rispetto a quella indicata sull'etichetta della fiala. Non deve essere riscontrata emoagglutinazione con il **CONTROL -**. Altrimenti il test non è valido.
- Il controllo del siero deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoagglutinazione di questo controllo, è necessario ripetere il test dopo l'eliminazione delle agglutinine anti-pecora naturali tramite assorbimento.
- Il controllo del reagente deve dare una reazione negativa (anello). In caso di emoagglutinazione di questo controllo, il reagente **ELI.H.A Toxo** non potrebbe essere usato.

11 - LETTURA DEI RISULTATI

Reazione negativa: Non emoagglutinazione. Presenza di un anello più o meno ampia sul fondo del pozzetto
Reazione positiva: Emoagglutinazione. Presenza di una pellicola rossiccia-marrone nel pozzetto: talvolta, la presenza di un anello periferico sottile.

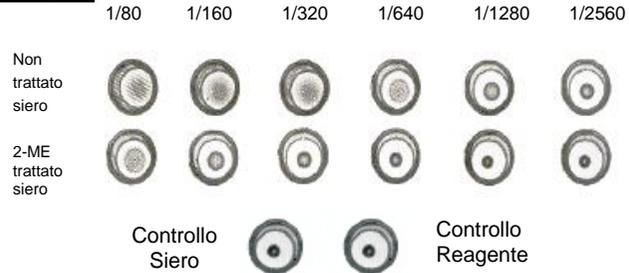
Di seguiti in annesso sono presentati nelle figure dell'emoagglutinazione, ottenute con sieri positivi:

Esempio 1:



↳ Siero positivo a 1/160. Assenza di IgM.

Esempio 2:



Non trattato siero positivo a 1/640 – 2-ME trattato siero positivo a 1/80

↳ **Siero positivo. Presenza di IgM.**

Il titolo viene dato prima diluizione che mostra un anello periferico ampio. Il titolo IU/mL è pari all'inverso di questa diluizione limite moltiplicato per la soglia di sensibilità stampata sulla confezione.

Esempio: Se un siero è positivo fino alla diluizione 1/320, e se la soglia di sensibilità è di 0,1 IU/mL, il titolo del siero sarà : $320 \times 0,1 = 32$ IU/mL.

12 – INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Titolo < 1/80 : Reazione negativa.

Assenza di anticorpi anti-toxoplasma o di importo non rilevabile.

- **Test di screening:** probabilmente paziente non immune richiedendo un sierologica di follow-up per le donne incinte.
- **Prova effettuata in caso di potenziale infezione acuta:** nessuna infezione da toxoplasma o infezione inizio molto recente.

Deve essere controllato su un secondo campione di per rilevare una possibile comparsa di anticorpi.

1/80 ≤ Titolo < 1/160: Reazione positiva.

Presenza a limite di velocità di anticorpi anti-Toxoplasma.

- **Test di screening:** il risultato deve essere interpretato in funzione dei risultati ottenuti con l'altra sierologica toxoplasma tecniche eseguite sul siero. Controllo, se necessario su un secondo campione.
- **Follow-up per le donne incinte ben sapere come non immunizzato o prova in caso di potenziale infezione acuta:** eventualmente di inizio di toxoplasmosi. IgM deve essere fatto.

Si raccomanda di eseguire un controllo con un secondo campione raccolto 15-21 giorni dopo.

Titolo ≥ 1/160: Reazione positiva.

Presenza di anticorpi anti-Toxoplasma.

- **Test di screening:** infezione probabilmente passato (anticorpi residui).
- **Follow-up per le donne incinte ben noto come non immunizzato o prova in caso di potenziale fase acuta:** toxoplasmosi acuta probabile.

Si raccomanda di trattare il siero con 2-ME soluzione per rilevare la presenza di anticorpi IgM, eseguire un controllo con un secondo campione.

Trattamento con 2-ME:

Una diminuzione di almeno 2 diluizioni prima del e dopo trattamento con 2-ME soluzione del siero significa che il siero contiene anticorpi IgM. Presunzione di toxoplasmosi acuta. In caso contrario: l'infezione da probabilmente passato (anticorpi residui).

13 - CAUSE DI ERRORE E LIMITAZIONI DEL TEST

- Cattiva conservazione del siero.
- Cattiva conservazione dei reagenti dopo l'apertura.
- Utilizzare esclusivamente i contagocce forniti nel kit.
- Non scambiare i contagocce tra reagenti **R1** e **R2**.
- In caso di reazione positiva nei primi sei pozzetti, effettuare diluizioni più elevate per determinare il titolo di emagglutinazione limite.

- Alcuni sieri, con un titolo anticorpale molto elevato, possono causare un fenomeno di zona (con retrazione della pellicola) alle prime diluizioni, che scompaiono con diluizioni crescenti.
- La nomenclatura francese di biologia medica agisce specifica due prove devono essere realizzate contemporaneamente per la diagnosi sierologica della toxoplasmosi. Pertanto, l'interpretazione complessiva di questa sierologia dovrà essere fatto secondo i risultati delle diverse tecniche utilizzate. In qualsiasi caso, la diagnosi dovrebbe essere avanzata usando i risultati di questo test insieme agli altri riscontri clinici, epidemiologici e di laboratorio.

14 - PRESTAZIONI DEL KIT

Il reagente soglia di sensibilità, espressa in IU/mL, è stampata sulla scatola. Differenti anticorpi corrispondenti alla varietà di antigeni coinvolti nelle infezioni Toxoplasma sono sviluppati durante la risposta immunitaria. La percentuale relativa di questi diversi anticorpi nel siero può essere diversa da un soggetto all'altro, e cambiare nel tempo per lo stesso paziente. La reattività verso ciascun anticorpo dei vari sistemi di diagnostica attualmente proposti è a seconda dell'antigene utilizzato per la reazione. Inoltre il rapporto relativo di anticorpi contenuti nello standard internazionale può differire da quella del siero del paziente. Pertanto, discrepanze significative nei valori IU/mL possono essere notati da un metodo all'altro. **Conseguentemente, l'espressione dei risultati in IU/mL deve essere correlato alla tecnica usata.**

La qualità dei reagenti permette l'effettuazione della reazione di sera, con lettura la mattina successiva, purché la micropiastra rimanga immobile e protetta da vibrazioni.

Il reagente **R1** è composto dei eritrociti sensibilizzati da un antigene Toxoplasma misto composto sia endogena toxoplasma e costituenti della membrana, che assicura sensibilità e specificità per la reazione.

Quindi, i risultati delle valutazioni di del test mostrano una sensibilità del 99,2 % ed una specificità del 97,7 %.

Inoltre, quando questo test è combinato con **ELITex Toxo**, la correlazione è compreso tra 98,2 (18) e 99,8% (17), a seconda della tecnica di riferimento utilizzato. Durante la "Réévaluation de 40 trousses de réactifs pour la détection des anticorps anti-toxoplasme de type IgG" di Medicines Agency nel 1998 marzo (19), 40 differenti sieri sono stati titolati con **ELI.H.A Toxo** :

- 9 sieri negativi sono risultati negativi ;
- Nessuna reazione negativa per 7 limite sieri positivi testati ;
- 24 sieri positivi sono stati trovati positivi.

15 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I campioni, i reagenti e i materiali e i prodotti contaminati devono essere smaltiti in un contenitore apposito per i rifiuti contaminati, in conformità alle raccomandazioni e norme vigenti per questa tipologia di prodotto nel paese di utilizzo.

In caso di versamento accidentale di reagente **BUF**, pulire la superficie con carta assorbente e acqua. In caso di versamento di siero o di un altro reagente, pulire la superficie con carta assorbente, acqua e candeggina.

16- REFERENZE

1. P. WATTRE, R. BRULE, A. CAPRON, J. SAMAILLE et J. FRUIT - Analyse antigénique de *Toxoplasma gondii* et diagnostic immunologique de la toxoplasmosse humaine - *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 1969, XX, 167-182.
2. P. AMBROISE-THOMAS - La toxoplasmosse - *Cahiers Médicaux Lyonnais*, 1972, 48.
3. P. AMBROISE-THOMAS - La détection des anticorps IgG et IgM dans le diagnostic de la toxoplasmosse acquise et la prévention de la toxoplasmosse 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 toxoplasmosse - *Ann. Biol. Clin.*, 1973, 31, 439-446.
5. CAPRON, P. WATTRE, A. VERNES et G. DELAUNOY - Le diagnostic immunologique de la toxoplasmosse - *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 toxoplasmosse 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 toxoplasmosse - *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 toxoplasmosse acquise ou congénitale. Bilan de 24.000 examens. - *Fondation Mérieux Edit.*, Lyon, 1975.
9. G. DESMONTS - Séro-diagnostic de la toxoplasmosse. Intérêt et limites des différentes méthodes. Leur application au diagnostic de la toxoplasmosse 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 toxoplasmosse 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 toxoplasmosse 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 toxoplasmosse 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 toxoplasmosse et à l'aspergillose - *Arch. Med. de l'Ouest*, 1979, 11, 1, 39-42.
17. J.-C. FOURLINNIE, 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 toxoplasmosse: 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 trousses de réactifs pour la détection des anticorps anti-toxoplasme de type IgG - *Revue française des laboratoires*, mars 1998, N° 301.

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

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>

