Bioclin

BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS

REF K270

INSTRUÇÕES DE USO

PARA OBTER AS INSTRUÇÕES DE USO EM FORMATO IMPRESSO, SEM CUSTO ADICIONAL, CONTATAR O SERVIÇO DE ASSESSORIA AO CLIENTE:

SAC: (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FINALIDADE

Teste imunoenzimático captura (ELISA) para determinação de Anticorpos da classe IgM Anti-*T. gondii* em amostras de sangue seco coletadas em papel filtro (DBS). Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimático.

O kit BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS é um ensaio imunoenzimático em fase sólida baseado no princípio de detecção qualitativa por captura de Anticorpos da classe IgM Anti-*Toxoplasma gondii* em amostras humanas de sangue seco coletadas em papel filtro. Anticorpos IgM presentes na amostra se ligam aos Anticorpos Anti-IgM revestidos na microplaca formando imunocomplexos. Após a incubação inicial, a microplaca é lavada para remover os materiais não ligados. Antígenos de *Toxoplasma gondii* conjugados à Peroxidase são adicionados à microplaca que é então incubada. Os Antígenos conjugados a enzima ligam-se aos Anticorpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* presentes, ligados à placa revestida com Anticorpos Anti-IgM. Nova lavagem é realizada para remover os excedentes. Após esta etapa, o Substrato é adicionado, produzindo uma cor azul que indica a quantidade de Anticorpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* presentes na amostra. A Solução de Parada é adicionada para interromper a reação havendo uma mudança de cor de azul para amarelo. A intensidade da cor é medida em 450 e 620 nm.

REAGENTES

1- Placa Sensibilizada – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Placa sensibilizada com Anticorpos Anti-IgM.

2- Conjugado – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Solução tampão, Antígenos de *Toxoplasma gondii* conjugados à Peroxidase, surfactante, estabilizantes, corante e conservante.

3- Lavagem Concentrada – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Solução Tampão (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloreto de Potássio < 100 mmol/L, Cloreto de Sódio < 5 mol/L), surfactante e conservante.

4- Substrato – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Solução Tampão contendo Peróxido de Uréia, Tetrametilbenzidina (TMB) e conservante.

5- Solução de Parada – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Ácido Clorídrico 1 M.

6- Tampão de Eluição – Conservar entre 2 e 8ºC. Contém: Solução Tampão, surfactante, estabilizante e conservante.

7- Controle Negativo DBS – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra não reativa para Anticorpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

8- Controle Positivo DBS – Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Amostra reativa para Anticorpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* impregnada em papel de filtro. **Potencialmente infectante.**

APRESENTAÇÃO

Reagentes	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1 – Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
2 - Conjugado	1 Frasco x 12 mL	1 Frascos x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
3 – Lavagem Concentrada	1 Frasco x 50 mL	1 Frasco x 100 mL	1 Frasco x 250 mL
4 – Substrato	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
5 - Solução de Parada	1 Frasco x 12 mL	1 Frasco x 24 mL	1 Frasco x 60 mL
6 – Tampão de Eluição	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 40 mL	1 Frasco x 100 mL
7 – Controle Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades
8 – Controle Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior

Materiais necessários não contidos no kit:

1- Pipetas capazes de dispensar volumes de 100 a 500 µL com coeficiente de variação menor que 1,5%.
2- Repipetador para pipetagens repetitivas de volumes de 300 µL com coeficiente de variação menor que 1,5% ou pipeta multicanal (OPCIONAL).
3- Lavadora de microplaca para técnica em papel filtro.
4- Leitora de ELISA com capacidade de absorbância em 450 e 630 nm de comprimento de onda.
5- Papel absorvente para secar as microcavidades.
6- Cronômetro ou relógio.
7- Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluição.
8- Água destilada ou deionizada.
9- Ferramentas de Controle de Qualidade.
10- Incubadora 37 ºC ± 2 ºC.
11- Picotador de papel (diâmetro de 3 ± 0,2 mm).

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 ºC. O transporte em temperaturas até 30 ºC não deverá exceder 5 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade. **Não congelar.**

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro*.
2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.
3- O sachê contendo a microplaca deve ser aberto somente após atingir a temperatura ambiente. Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no sachê, vedar e conservar entre 2 e 8 ºC.
4- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes.
5- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos, e agentes oxidantes e redutores que podem alterar de forma significativa os resultados.
6- A Solução de Parada contém Ácido Clorídrico que é um ácido forte. Portanto, manuseá-lo com devido cuidado.
7- Toda matéria-prima do produto é testada sendo não reagente para HBsAg e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação de todo produto que contém amostra biológica é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
9- Por medida de proteção, deve-se cobrir a placa durante a reação.
10- Deve-se assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
11- Não exponha os reagentes, especialmente o Substrato, à luz forte ou vapores de Hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
12- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.
13- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.
14- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.
15- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Sangue Seco coletado em papel filtro (DBS) - EDTA ou Punção

O papel filtro utilizado deve ser específico para coleta de amostras de sangue seco, a exemplo dos modelos S&S 903 e Ahlstrom 226. O laboratório deve certificar da qualidade das amostras antes da sua utilização.

As amostras de sangue seco em papel de filtro podem ser armazenadas à temperatura ambiente desde que fiquem protegidas de fonte de luz solar direta e em baixa umidade. Para armazenamento de até 2 anos, as amostras devem permanecer sob refrigeração, entre 2 e 8 °C. O armazenamento por tempo superior a 2 anos, deve ser realizado na temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

Estabilidade Após Aberto

Os resultados do teste de estabilidade comprovam que o kit BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS é estável após aberto por até 30 dias. Esta estabilidade pode variar de acordo com as condições do teste e do ambiente. Portanto, sugere-se acompanhar o desempenho do produto utilizando controles internos do kit e os critérios de validação da técnica.

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Solução de Lavagem

Diluir o conteúdo do frasco Nº 3 (Lavagem Concentrada) na proporção 1:20 de água destilada ou deionizada; por exemplo: 50 mL de solução de Lavagem Concentrada em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo, a solução pode ser estocada entre 2 e 30 ºC por até 30 dias. Caso ocorra cristalização, aquecer a 37 °C até dissolução.

Todos os demais reagentes são prontos para uso.

TÉCNICA

Para uso em equipamentos automáticos, consulte ao SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente).

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 – 30 ºC) por no mínimo 40 minutos.

1- Separar as cavidades a serem utilizadas considerando: Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel de filtro (recomenda-se testar em duplicata). Retornar as tiras não utilizadas da microplaca para a embalagem original selada.
2- Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL).
3- Adicionar um disco de 3mm de Controle Positivo DBS, Controle Negativo DBS e amostras de sangue seco coletadas em papel filtro, previamente picotados, nas cavidades determinadas.
4- Pipetar 100 µL do Tampão de Eluição, em todas as cavidades. **Inclusive na cavidade para o Branco.**
5- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos, cobrir as cavidades com selador de placas.
6- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
7- Após incubação, descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora para técnica de papel filtro). Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem, **previamente preparada**, e efetuar um total de cinco (5) ciclos de lavagem com agitação (*shake*) de 5 segundos. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.
Nota: Lavagem/secagem deficiente pode causar resultados inadequados.
8- Pipetar 100 µL de Conjugado em todas as cavidades. **Inclusive na cavidade do Branco.**
9- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
10- Incubar por 30 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
11- Retirar o selador de placa das cavidades.
12- Repetir o item 7.
13- Pipetar 100 µL de Substrato em todas as cavidades. **Inclusive na cavidade do Branco.**
14- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos. Cobrir as cavidades com o selador de placa.
15- Incubar por 10 minutos ± 2 minutos em uma incubadora a 37 °C ± 2 °C.
16- Retirar o selador de placa das cavidades.
17- Pipetar 100 µL de Solução de Parada em todas as cavidades.
18- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
19- Ler utilizando filtro duplo: 450 nm / 630 nm em até 15 minutos (no máximo).

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura do Branco e dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

ITEM	ABSORBÂNCIA
Branco	< 0,150
Controle Negativo DBS	< 0,150
Controle Positivo DBS	> 0,500

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS

QUALITATIVOS

Calcular *Cut Off* de acordo com a seguinte fórmula:
Cut Off = Absorbância Média do Controle Negativo DBS + 0,100.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Controle Negativo DBS	0,020
	0,022
Cut Off = (Absorbância Média do Controle Negativo DBS) + 0,100	((0,020 + 0,022) / 2) + 0,100 = 0,120

Calcular o Índice dividindo a absorbância da amostra pelo valor de *Cut Off*.

Exemplo:

ITEM	ABSORBÂNCIAS
Amostra	1,352
Valor de *Cut Off*	0,120
Índice = Amostra / Valor de *Cut Off*	1,352 / 0,120 = 11,27

Nota: Os dados apresentados nos exemplos são apenas para ilustração e não podem ser usadas para cálculo dos resultados.
Cada laboratório deverá validar o *Cut Off* conforme instrumentação utilizada e população pesquisada.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o cálculo do índice das amostras, considerar os índices abaixo para determinação dos resultados.

RESULTADOS	QUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo (Não Reagente)	≤ 0,8
Indeterminado	Entre 0,8 e 1,2
Positivo (Reagente)	≥ 1,2

Amostras com índice superior ou igual a 1,2 são consideradas como positivas, amostras com índice inferiores ou igual a 0,8 são consideradas como negativas e amostras que apresentam índice entre 0,8 e 1,2 são consideradas indeterminadas. Dessa forma, temos que a amostra citada no exemplo, cuja absorbância foi 1,352 e índice de 11,27, apresenta resultado positivo (índice ≥ 1,2).

Observações: No caso de resultado indeterminado, a amostra deve ser reanalisada em duplicata. As amostras que obtiverem resultados repetidamente indeterminados devem ser retestadas utilizando um método alternativo. Se os resultados permanecerem indeterminados, deve-se coletar uma nova amostra em duas semanas. Deve prevalecer o resultado da última amostra coletada. A interpretação de um teste diagnóstico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Devem-se incluir outros testes de confirmação antes que uma amostra seja considerada positiva. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis, antes do diagnóstico descritivo da doença. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

A interpretação de um teste diagnostico não deve ser estabelecida com base em um único ensaio. Todos os resultados devem ser interpretados em conjunto com outras informações clínicas disponíveis antes do diagnóstico definitivo. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

INTERFERENTES

Nenhuma interferência foi observada para as concentrações de Triglicérides 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albumina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Fator Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reativa 41,2 mg/dL e Anti-Estreptolisina O 1023 UI/mL.

REATIVIDADE CRUZADA

Foi realizado um estudo com 48 amostras de sangue seco coletada em papel de filtro negativas para Toxoplasmose IgM, mas positivas para outras infecções, a fim de se avaliar a possibilidade de reatividade cruzada destes interferentes no resultado do BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS. Dentre elas 5 amostras positivas para HTLV, 6 amostras positivas para Sífilis, 6 amostras positivas para HBsAg, 5 amostras positivas para HCV, 7 amostras positivas para Doença de Chagas, 6 amostras positivas para Zika, 4 amostras positivas para CMV, 4 amostras positivas para Rubéola e 5 amostras positivas para HIV. Não foi observado reatividade cruzada com amostras positivas para HTLV, Sífilis, HBsAg, HCV, Doença de Chagas, Zika, CMV, Rubéola e HIV. Apesar dos resultados encontrados, não se pode descartar completamente a possibilidade de reatividade cruzada. O diagnostico final deve considerar os dados clínicos do paciente juntamente com outros dados laboratoriais.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

DESEMPENHO DO PRODUTO

PRECISÃO

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Repetibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	1,3081	0,6429	0,0425
Desvio Padrão	0,0480	0,0300	0,0027
Coeficiente de Variação (%)	3,6667	4,6622	6,2990

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 10 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com valores diferentes, obtendo-se os seguintes resultados de absorbância:

Reprodutibilidade	Amostra		
	1	2	3
Média	1,2985	0,6553	0,0433
Desvio Padrão	0,0597	0,0293	0,0030
Coeficiente de Variação (%)	4,5930	4,4741	6,9427

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

O kit BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS foi utilizado para a análise de amostras clínicas previamente caracterizadas e confirmadas através de outro método de enzimaimunoensaio de referência. Os resultados mostram que a sensibilidade clínica do kit BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS é 98,82% e a especificidade clínica é 98,98%.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS	Positivo	84	1	85
	Negativo	1	97	98
	Total	85	98	183

Sensibilidade Clínica: 98,82% (84/85) IC 95% = 93,60 a 100%
Especificidade Clínica: 98,98% (97/98) IC 95% = 94,40 a 100%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Toxoplasma gondii é o agente causador da toxoplasmose. É um protozoário intracelular obrigatório que tem sido encontrado em muitas espécies de aves, répteis e mamíferos. O agente pode ser transmitido através de transplante de órgãos, transfusão de sangue e de leucócitos, contato com fezes de gatos contaminados e ingestão de carnes cruas contaminadas. Nos adultos, a infecção é geralmente benigna ou assintomática. No entanto, os casos sintomáticos, incluindo casos fatais ocorrem em pacientes imunossuprimidos que tem evidência clínica ou laboratorial de danos ao sistema nervoso central. Após a infecção, os Anticorpos IgM aparecem em 5 dias e apresentam níveis reduzidos dentro de algumas semanas ou meses. Os Anticorpos IgG aparecem geralmente de 1 - 2 semanas após a infecção, alcançando níveis de pico em 6 - 10 semanas persistindo para toda a vida. Nas crianças, o risco de infecção fetal varia de acordo com o tempo de gravidez, quando a mãe é infectada. Em infecções maternas que ocorrem durante o primeiro trimestre, a probabilidade da infecção passar para o feto é menor. No entanto, se a transmissão ocorre, desfechos graves, como aborto espontâneo e hidrocefalia, são mais prováveis. Infecções adquiridas mais tarde na gravidez, onde as transmissões fetais ocorrem com mais frequência, tendem ser menos graves, mas mesmo assim podem gerar manifestações congênitas, incluindo calcificações cerebrais e aprendizagem deficiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feldman, HA. Toxoplasmosis: An Overview. Acad. Med. (1974) 50:110-127.
2. Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult. Acad. Med. (1974) 50:211-227.
3. McLeod, R, and Remington JS. In Harrison.s Principles of Internal Medicine. (1980) 879-885.
4. Frenkel, JK. Toxoplasma in and Around Us. Bioscience. (1973) 23:343-352.
5. Feldman, HA. Epidemiology of Toxoplasma Infections, Epid. Rev. (1982) 4:204-213.
6. Krick, JA, and Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult – An Overview. N. Engl. J. Med. (1978) 298(10):550-553.
7. Bryan, RT, and Wilson, M. Toxoplasmosis. Lab Management (1988) 26:40-43.
8. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e Monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais.
9. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR
Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit BIOLISA TOXOPLASMOSE IgM DBS na ANVISA: 10269360387

Revisão: Outubro/2024

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

Bioclin

BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS

REF K270

INSTRUCCIONES DE USO

PARA OBTENER LAS INSTRUCCIONES DE USO EN FORMATO IMPRESO, SIN COSTO ADICIONAL, CONTACTE CON EL SERVICIO DE ASESORAMIENTO AL CLIENTE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FINALIDAD

Prueba inmunoenzimática captura (ELISA) para determinación de Anticuerpos de clase IgM Anti-*T. gondii* en muestras de sangre seca recolectadas en papel de filtro (DBS). Sólo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Enzimainmunoensayo o inmunoenzimatico

El kit BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida basado en el principio de detección cualitativa mediante la captura de Anticuerpos de la clase IgM Anti-*Toxoplasma gondii* en muestras humanas de sangre seca recolectadas en papel de filtro. Los Anticuerpos IgM presentes en la muestra se unen a los Anticuerpos Anti-IgM que recubren la microplaca y forman complejos inmunitarios. Después de la incubación inicial, la microplaca se lava para eliminar los materiales no unidos. Se añaden antígenos de *Toxoplasma gondii* conjugados con Peroxidasa a la microplaca que luego se incuba. Los Antígenos conjugados con enzima se unen a los Anticuerpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* presentes, unidos a la placa recubierta con Anticuerpos Anti-IgM. Se realiza un nuevo lavado para eliminar el sobrante. Luego de este paso, se agrega el Sustrato, produciendo un color azul que indica la cantidad de Anticuerpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* presentes en la muestra. Se agrega Solución de Parada para detener la reacción con un cambio de color de azul a amarillo. La intensidad del color se mide a 450 y 620 nm.

REACTIVOS

1- Placa Sensibilizada – Conservar entre 2 y 8ºC. Contiene: Placa sensibilizada con Anticuerpos Anti-IgM.
2- Conjugado – Conservar entre 2 y 8ºC. Contiene: Solución Tampón, Antígenos de *Toxoplasma gondii* conjugados a Peroxidasa, surfactante, estabilizantes, colorante y conservante.
3- Lavado Concentrado – Conservar entre 2 y 8ºC. Contiene: Solución Tampón (Fosfato < 0,5 mol/L, Cloruro de Potasio < 100 mmol/L, Cloruro de Sodio < 5 mol/L), tensioactivo y conservante.
4- Sustrato – Conservar entre 2 y 8ºC. Contiene: Solución Tampón que contiene Peróxido de Urea, Tetrametilbencidina (TMB) y conservante.
5- Solución de Parada – Almacenar entre 2 y 8ºC. Contiene: Ácido Clorhídrico 1 M.
6- Tampón de Elución – Conservar entre 2 y 8ºC. Contiene: Solución Tampón, tensioactivo, estabilizante y conservante.
7- Control Negativo DBS – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Mancha no reactiva para anticuerpos IgM Anti-*Toxoplasma gondii* impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**
8- Control Positivo DBS – Conservar entre 2 y 8°C. Contiene: Mancha reactiva para anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma gondii* impregnada en papel de filtro. **Potencialmente infeccioso.**

PRESENTACIÓN

REACTIVOS	1	2	3
	96 Cavidades	192 Cavidades	480 Cavidades
1- Placa Sensibilizada	1 Unidade	2 Unidades	5 Unidades
2- Conjugado	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3- Lavado Concentrado	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4- Sustrato	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5- Solución de Parada	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6-Tampón de Elución	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
7- Control Negativo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades
8- Control Positivo DBS	1 Unidade	2 Unidades	3 Unidades

EQUIPOS E INSUMOS OPERACIONALES

Materiales contenidos en el kit:
- Reactivos descritos en el cuadro anterior.

Materiales necesarios, no contenidos en los Kit:
1- Pipetas capaces de dispensar volúmenes de 100 a 500 µL con coeficiente de variación menor que 1,5%.
2- Repipetadores para pipetajes repetitivos de volúmenes de 300 µL com coeficiente de variación menor que 1,5% o pipeta multicanal (OPCIONAL).
3- Lavadora de microplaca para técnica em papel filtro.
4- Lectora de ELISA con capacidad de absorbancia en 450 y 630 nm de longitud de onda.
5- Papel absorvente para secar las microcavidades.
6- Cronómetro o reloj.
7- Vial para almacenar la Solución de Lavado luego de diluída.
8- Agua destilada o deionizada.
9- Herramientas de Control de Calidad.
10- Incubadora de 37ºC ± 2ºC.
11- Trituradora de papel (diámetro 3 ± 0,2 mm).

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento debe ser de 2 a 8°C. El transporte a temperaturas de hasta 30ºC no debe exceder los 5 días. Mantener alejado de la luz y evitar la humedad. **No congelar.**

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro*.
2- Siga estrictamente la metodología propuesta para obtener resultados exactos.
3- El sobre de aluminio que contiene la microplaca debe abrirse solo después de alcanzar la temperatura ambiente. Vuelva a colocar las tiras de microcavidades no utilizadas en el sobre de aluminio, séllelo y guárdelo entre 2 y 8 °C.
4- El agua utilizada para la limpieza del material debe ser fresca y libre de contaminantes.
5- Las columnas desionizantes saturadas liberan agua alcalina, diversos iones y agentes oxidantes y reductores que pueden alterar significativamente los resultados.
6- La Solución de Parada contiene Ácido Clorhídrico, que es un ácido fuerte. Por lo tanto, manéjelo con el debido cuidado.
7- Toda la materia prima del producto está testeada y debe ser no reactiva para HBsAg, Anti-HIV 1&2 y Anti-HCV. Sin embargo, estas pruebas no ofrecen total seguridad en ausencia de agentes infecciosos. La manipulación de cualquier producto que contenga sudor es potencialmente capaz de transmitir enfermedades. Por lo tanto, es necesario tener los necesarios cuidados de bioseguridad en el manejo de estos productos.
8- Pipetear siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia de tiempo de reacción entre las microcavidades.
9- Para protección, cubra la placa durante la reacción.
10- Asegúrese de que el fondo de la cavidad esté limpio y seco y que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer la placa. No permita que los pocillos se sequen durante la prueba.
11- No exponer los reactivos, especialmente el Sustrato, a luz brillante o vapores de Hipoclorito durante las etapas de almacenamiento o incubación.
12- Se recomienda la aplicación de la ley de protección ambiental local, estatal y federal para la eliminación de reactivos y material biológico si se hace de acuerdo con la legislación vigente.
13- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consulte la HDS (Hoja de Dados de Seguridad) disponible en el site www.bioclin.com.br o solicitándola a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
14- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
15- Es indispensable que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódico.

MUESTRAS

Sangre seca coletado en papel de filtro (DBS) - EDTA o Punción
El papel filtro utilizado debe ser específico para la toma de muestras de sangre seca, como los modelos S&S 903 y Ahlstrom 226. El laboratorio debe certificar la calidad de las muestras antes de su uso.
Las muestras de sangre secadas en papel de filtro se pueden almacenar a temperatura ambiente siempre que estén protegidas de la luz solar directa y en condiciones de baja humedad. Para almacenamiento de hasta 2 años, las muestras deben permanecer refrigeradas, entre 2 y 8 °C. El almacenamiento por un período superior a 2 años debe realizarse a una temperatura de -20 °C.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Estabilidad Después de Abierto
Los resultados de la prueba de estabilidad demuestran que el kit BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS es estable después de abrirlo hasta 30 días. Esta estabilidad puede variar según la prueba y las condiciones ambientales. Por lo tanto, se sugiere monitorear el desempeño del producto utilizando los controles internos del kit y los criterios de validación de la técnica.

PREPARO DE LOS REACTIVOS DE TRABAJO

Solución de Lavado
Diluir el contenido de la ampolla Nº 3 (Lavado Concentrado) en proporción 1:20 de agua destilada o desionizada; por ejemplo: 50 mL de Solución de Lavado Concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada. Después de la preparación, la solución puede almacenarse entre 2 y 30 °C durante un máximo de 30 días. Si ocurre cristalización, calentar a 37 °C hasta disolución.

Todos los demás reactivos están listos para usar.

TÉCNICA

Para uso en equipos automáticos contactar con el SAC (Servicio de Atención al Cliente).
Antes de comenzar el ensayo, coloque todos los reactivos, muestras y controles para que se estabilicen a temperatura ambiente (15 - 30 ºC) durante al menos 40 minutos.
1- Separar los pocillos a utilizar considerando: Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca colectadas en papel filtro (se recomienda realizar la prueba por duplicado). Devuelva las tiras de microplacas no utilizadas al paquete sellado original.
2- Separar la primera cavidad para el Blanco (OPCIONAL).
3- Agregar un disco de 3mm de Control Positivo DBS, Control Negativo DBS y muestras de sangre seca recolectadas en papel filtro, previamente perforado, en los pocillos determinados.
4- Pipetear 100 µL de Tampón de Elución en todos los pocillos. **Incluyendo la cavidad de Blanco.**
5- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos, cubrir los pocillos con sellador de placas.
6- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
7- Después de la incubación, desechar el contenido de los pozos por aspiración (Técnica Lavadora para papel filtro). Utilice aproximadamente 300 µL de Solución de Lavado **previamente preparada** y realice un total de cinco (5) ciclos de lavado con agitación de 5 segundos. Para garantizar el secado de la placa, al final del lavado, golpee la placa durante unos segundos sobre papel absorbente.
Nota: Un lavado/secado deficiente puede causar malos resultados.
8- Pipetear 100 µL de Conjugado en todos los pocillos. **Incluido en la cavidad de Blanco.**
9- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
10- Incubar durante 30 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 ºC ± 2 ºC.
11- Retire el sellador de placas de los pocillos.
12- Repetir el punto 7.
13- Pipetear 100 µL de Sustrato en todos los pocillos. **Incluido en la cavidad de Branco.**
14- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos. Cubra los pocillos con el sellador de placas.
15- Incubar durante 10 minutos ± 2 minutos en una incubadora a 37 °C ± 2 °C.
16- Retire el sellador de placas de los pocillos.
17- Pipetee 100 µL de solución de parada en todos los pocillos.
18- Homogeneizar suavemente durante ± 30 segundos.
19- Lectura con doble filtro: 450 nm / 630 nm en hasta 15 minutos (máximo).

VERIFICACIÓN DE LA TÉCNICA

Verifique si los resultados obtenidos para la lectura del Blanco y los Controles son compatibles con los valores que se presentan a continuación:

ITEM	ABSORBANCIA
Blanco	< 0,150
Control Negativo DBS	< 0,150
Control Positivo DBS	> 0,500

Si los valores están fuera de los valores esperados, se debe repetir la técnica.

CÁLCULOS

CUALITATIVOS
Calcular *Cut Off* de acuerdo con la fórmula siguiente:
Cut Off = Absorbancia media del control negativo DBS + 0,100.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Control Negativo DBS	0,020
	0,022
Cut Off = (Absorbancia Media del Control Negativo DBS) + 0,100	((0,020 + 0,022) / 2) + 0,100 = 0,120

Calcular el Indice dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de *Cut Off*.

Ejemplo:

ITEM	ABSORBANCIA
Muestra	1,352
Valor del *Cut Off*	0,120
Indice = Muestra/ Valor del *Cut Off*	1,352 / 0,120 = 11,27

Nota: Los datos que se muestran en los ejemplos son solo ilustrativos y no se pueden utilizar para el cálculo de resultados.
Cada laboratorio debe validar el *Cut Off* de acuerdo con la instrumentación utilizada y la población investigada.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Después del cálculo del índice de las muestras, considerar los índices abajo para la determinación de los resultados.

RESULTADOS	CUALITATIVO
	ÍNDICE
Negativo (No Reactivo)	≤ 0,8
Indeterminado	Entre 0,8 y 1,2
Positivo (Reactivo)	≥ 1,2

Las muestras con un índice mayor o igual a 1,2 se consideran positivas, las muestras con un índice menor o igual a 0,8 se consideran negativas y las muestras con un índice entre 0,8 y 1,2 se consideran indeterminadas. Así, la muestra mencionada en el ejemplo, cuya absorbancia fue 1,352 e índice 11,27, presenta un resultado positivo (índice ≥ 1,2).

Notas: En caso de resultados indeterminados, la muestra debe volver a analizarse por duplicado. Las muestras que arrojan resultados indeterminados repetidamente deben volver a analizarse con un método alternativo. Si los resultados siguen siendo indeterminados, se debe recolectar una nueva muestra en dos semanas. Prevalecerá el resultado de la última muestra recogida. La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Se deben incluir pruebas de confirmación adicionales antes de que una muestra se considere positiva. Un resultado negativo no excluye la posibilidad de exposición. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible, antes de realizar un diagnóstico descriptivo de la enfermedad.
Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

La interpretación de una prueba diagnóstica no debe basarse en una sola prueba. Todos los resultados deben interpretarse junto con otra información clínica disponible antes del diagnóstico definitivo. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

INTERFERENTES

No se observó interferencia para las concentraciones de Triglicéridos 1200 mg/dL, Ácido Acetilsalicílico 20 mg/dL, Ácido Ascórbico 2 g/dL, Creatina 200 mg/dL, Bilirrubina 1 g/dL, Albúmina 10 g/dL, Hemoglobina 1000 mg/dL, Ácido Oxálico 60 mg/dL, Factor Reumatoide 980 UI/mL, Proteína C Reactiva 41,2 mg/dL y Antiestreptolisina O 1023 UI/mL.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se realizó un estudio con 48 muestras de sangre seca recolectadas en papel filtro negativas para Toxoplasmosis IgM, pero positivas para otras infecciones, con el fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzada de estos interferentes en el resultado de BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS. Entre ellas 5 muestras positivas para HTLV, 6 muestras positivas para Sífilis, 6 muestras positivas para HBsAg, 5 muestras positivas para VHC, 7 muestras positivas para Enfermedad de Chagas, 6 muestras positivas para Zika, 4 muestras positivas para CMV, 4 muestras positivas para Rubéola y 5 muestras VIH positivas. No se observó reactividad cruzada con muestras positivas para HTLV, Sífilis, HBsAg, VHC, Enfermedad de Chagas, Zika, CMV, Rubéola y VIH. A pesar de los resultados encontrados, no se puede descartar por completo la posibilidad de reactividad cruzada. El diagnóstico final debe considerar los datos clínicos del paciente junto con otros datos de laboratorio.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe contar con un programa interno de control de calidad, donde se establezcan claramente los procedimientos, estándares, límites y tolerancia a las variaciones. Es importante señalar que todos los sistemas de medición tienen una variabilidad analítica característica, la cual debe ser monitoreada por los propios laboratorios. Para eso, se recomienda el uso de controles, que permitan evaluar la precisión y exactitud de las dosificaciones.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

PRECISIÓN

Repetibilidad
La repetibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia:

Repetibilidad	Muestra		
	1	2	3
Promedio	1,3081	0,6429	0,0425
Desvío Patrón	0,0480	0,0300	0,0027
Coeficiente de Variación (%)	3,6667	4,6622	6,2990

Reproductibilidad
La reproductibilidad fue calculada a partir de 10 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con valores diferentes, obteniéndose los siguientes resultados de absorbancia:

Reproductibilidad	Muestra		
	1	2	3
Promedio	1,2985	0,6553	0,0433
Desvío Patrón	0,0597	0,0293	0,0030
Coeficiente de Variación (%)	4,5930	4,4741	6,9427

SENSIBILIDAD E ESPECIFICIDAD CLÍNICA

El kit BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS se utilizó para el análisis de muestras clínicas previamente caracterizadas y confirmadas por otro método de inmunoensayo enzimático de referencia. Los resultados muestran que la sensibilidad clínica del kit BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS es del 98,82 % y la especificidad clínica es del 98,98 %.

		Resultado Referência		
		Positivo	Negativo	Total
BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS	Positivo	84	1	85
	Negativo	1	97	98
	Total	85	98	183

Sensibilidad clínica: 98,82 % (84/85) IC 95 % = 93,60 a 100 %
Especificidad Clínica: 98,98% (97/98) IC 95% = 94,40 a 100%

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

Toxoplasma gondii es el agente causal de la toxoplasmosis. Es un protozoario intracelular obligado que se ha encontrado en muchas especies de aves, reptiles y mamíferos. El agente puede transmitirse a través de trasplantes de órganos, transfusiones de sangre y leucocitos, contacto con gatos infectados e ingestión de carne cruda contaminada. En adultos, la infección es generalmente benigna o asintomática. Sin embargo, los casos sintomáticos, incluidos los casos fatales, ocurren en pacientes inmunodeprimidos que tienen evidencia clínica o de laboratorio de daño al sistema nervioso central. Después de la infección, los anticuerpos IgM aparecen a los 5 días y presentan niveles reducidos a las pocas semanas o meses. Los anticuerpos IgG generalmente aparecen de 1 a 2 semanas después de la infección, alcanzan niveles máximos en 6 a 10 semanas y persisten de por vida. En los niños, el riesgo de infección fetal varía según el momento de vergüenza cuando la madre se infecta. En las infecciones maternas que ocurren durante el primer trimestre, la probabilidad de que la infección pase al feto es menor. Sin embargo, si se produce la transmisión, es más probable que se produzcan resultados graves, como aborto espontáneo e hidrocefalia. Las infecciones adquiridas posteriormente en el bochorno, donde las transmisiones fetales ocurren con mayor frecuencia, suelen ser menos graves, pero aun así pueden generar manifestaciones congénitas, incluyendo calcificaciones cerebrales y problemas de aprendizaje.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feldman, HA. Toxoplasmosis: An Overview. Acad. Med. (1974) 50:110-127.
2. Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult. Acad. Med. (1974) 50:211-227.
3. McLeod, R, and Remington JS. In Harrison.s Principles of Internal Medicine. (1980) 879-885.
4. Frenkel, JK. Toxoplasma in and Around Us. Bioscience. (1973) 23:343-352.
5. Feldman, HA. Epidemiology of Toxoplasma Infections, Epid. Rev. (1982) 4:204-213.
6. Krick, JA, and Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult – An Overview. N. Engl. J. Med.(1978) 298(10):550-553.
7. Bryan, RT, and Wilson, M. Toxoplasmosis. Lab Management (1988) 26:40-43..
8. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e Monitoramento das
DST, Aids e Hepatites Virais.
9. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos **Bioclin** son testados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de validad mencionada en el embalaje de presentacion, desde que sean almacenados y transportados en las condiciones adecuadas.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil
Tel.: +55 31 3439-5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileña

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR
Servicio de Asesoría al Cliente
Tel. : 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro del kit BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS en la ANVISA: 10269360387

Revisión: Octubre/2024

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

Bioclin

BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS

REF **K270**

INSTRUCTIONS FOR USE

TO OBTAIN THE INSTRUCTIONS FOR USE IN PRINTED FORMAT, AT NO ADDITIONAL COST, CONTACT CUSTOMER ADVISORY SERVICE:

SAC: +55 (31) 3439 5454 / 0800 031 5454 / sac@bioclin.com.br

FUNCTION

Immunoenzymatic test capture (ELISA) for determination of IgM class Antibodies Anti-*T. gondii* in dried blood spot collected on filter paper (DBS). Only for *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Enzyme immunoassay or immunoenzymatic

The BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS kit is a solid-phase immunoenzymatic assay based on the principle of qualitative detection by capturing Antibodies of the IgM Anti-*Toxoplasma gondii* class in human samples of dried blood collected on filter paper. IgM antibodies present in the sample bind to Anti-IgM Antibodies coated on the microplate forming immune complexes. After the initial incubation, the microplate is washed to remove unbound materials. Peroxidase-conjugated *Toxoplasma gondii* antigens are added to the microplate which is then incubated. The enzyme-conjugated Antigens bind to the Anti-*Toxoplasma gondii* IgM Antibodies present, bound to the plate coated with Anti-IgM Antibodies. A new wash is carried out to remove the surplus. After this step, the Substrate is added, producing a blue color that indicates the amount of Anti-*Toxoplasma gondii* IgM Antibodies present in the sample. Stopping Solution is added to stop the reaction with a color change from blue to yellow. Color intensity is measured at 450 and 620 nm.

REAGENTS

1- Sensitized Plate – Store between 2 and 8ºC. Contains: Plate sensitized with Anti-IgM Antibodies.
2- Conjugate – Store between 2 and 8ºC. Contains: Buffer Solution, *Toxoplasma gondii* Antigens conjugated to Peroxidase, surfactant, stabilizers, dye and preservative.
3- Concentrated Wash – Store between 2 and 8ºC. Contains: Buffer Solution (Phosphate < 0.5 mol/L, Potassium Chloride < 100 mmol/L, Sodium Chloride < 5 mol/L), surfactant and preservative.
4- Substrate – Store between 2 and 8ºC. Contains: Buffer Solution containing Urea Peroxide, Tetramethylbenzidine (TMB) and preservative.
5- Stop Solution – Store between 2 and 8ºC. Contains: Hydrochloric Acid 1 M.
6- Elution Buffer – Store between 2 and 8ºC. Contains: Buffer Solution, surfactant, stabilizer and preservative.
7- DBS Negative Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Non-reactive sample for Anti-*Toxoplasma gondii* IgM Antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**
8- DBS Positive Control – Store between 2 and 8°C. Contains: Reactive sample for Anti-*Toxoplasma gondii* IgM Antibodies impregnated on filter paper. **Potentially infectious.**

PRESENTATION

REAGENTS	1	2	3
	96 Cavities	192 Cavities	480 Cavities
1 – Sensitized Plate	1 Unit	2 Units	5 Units
2 - Conjugate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
3 –Concentrated Wash	1 Vial x 50 mL	1 Vial x 100 mL	1 Vial x 250 mL
4 – Substrate	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
5 - Stop Solution	1 Vial x 12 mL	1 Vial x 24 mL	1 Vial x 60 mL
6 – Elution Buffer	1 Vial x 20 mL	1 Vial x 40 mL	1 Vial x 100 mL
7 – DBS Negative Control	1 Unit	2 Units	3 Units
8 – DBS Positive Control	1 Unit	2 Units	3 Units

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Materials in the kit:
- Reagents described in the above table

Required materials not contained in the Kit:
1- Pipettes capable of dispensing volumes from 100 to 500 µL with a coefficient of variation less than 1.5%.
2- Repeater for repetitive pipetting of volumes of 300 µL with coefficient of variation less than 1.5% or multichannel pipette (OPTIONAL).
3- Microplate washer for technique on filter paper.
4- ELISA reader with absorbance capacity at 450 and 630 nm of wavelength.
5- Absorbent paper to dry the microcavities.
6- Stopwatch or clock.
7- Bottle to store the Washing Solution after dilution.
8- Distilled or deionized water.
9- Quality Control Tools.
10- Incubator 37 ± 2 ºC.
11- Paper shredder (diameter 3 ± 0.2 mm).

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The storage temperature should be 2 to 8°C. Transport at temperatures up to 30ºC should not exceed 5 days. Keep away from light and avoid humidity. **Do not freeze.**

SPECIAL CARE

1- For *in vitro* diagnostic use only.
2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
3- The sachet containing the microplate should be opened only after it reaches room temperature. Place the strip with unused cavities in the sachet, seal and store at 2 to 8°C.
4- The water used in material cleaning must to be recent and free of contaminants.
5- Deionized and saturated columns release alkaline water, several ions and oxidizing and reducing agents that can significantly alter the results.
6- Stop Solution contains Hydrochloric Acid, which is a strong acid. Handle it with care.
7- All the raw material of product is tested and should be nonreactive for HBsAg, HIV 1 & 2 and Anti HCV. However, these tests do not provide total assurance of the absence of infectious agents. The manipulation of any product containing human serum is potentially capable of transmitting diseases. Therefore, we must take due care in handling the biosafety of these products.
8- Always add reagents in the same order to minimize the difference in reaction time between the cavities.
9- As a safety measure, you should cover the plate during the reaction.
10- You must ensure that the bottom of the cavity is clean and dry and there are no bubbles on the surface fluid before reading the plate. Do not let the cavities run dry during the test.
11- Do not expose reagents, especially the Substrate, to strong light or Hypochlorite fumes during storage or incubation steps.
12- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
13- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the SDS (Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.
14- Do not use the product in case of damaged packaging.
15- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Dried Blood collected on filter paper (DBS) - EDTA or Puncture
The filter paper used must be specific for collecting dried blood samples, such as the S&S 903 and Ahlstrom 226 models. The laboratory must certify the quality of the samples before use.
Blood samples dried on filter paper can be stored at room temperature as long as they are protected from direct sunlight and in low humidity. For storage of up to 2 years, the samples must remain refrigerated, between 2 and 8 °C. Storage for a period longer than 2 years must be carried out at a temperature of -20°C.

DESCRIPTION OF PROCESS

Stability After Opening
The results of the stability test prove that the BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS kit is stable after opening for up to 30 days. This stability may vary according to test and environmental conditions. Therefore, it is suggested to monitor the performance of the product using the kit's internal controls and the technique validation criteria.

PREPARATION OF WORKING REAGENTS

Washing Solution
Dilute the contents of vial Nº 3 (Concentrated Wash) in a 1:20 ratio of distilled or deionized water; for example: 50 mL of Concentrated Wash solution in 1000 mL of distilled or deionized water. After preparation, the solution can be stored between 2 and 30°C for up to 30 days. If crystallization occurs, heat to 37 °C until dissolution.

All other reagents are ready to use.

TECHNIQUE

For use in automatic equipment, contact SAC (Customer Advice Service).
Before starting the assay, place all reagents, samples and controls to stabilize at room temperature (15 – 30 ºC) for at least 40 minutes.
1- Separate the wells to be used considering: DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper (it is recommended to test in duplicate). Return unused microplate strips to the original sealed package.
2- Separate the first cavity for the Blank (OPTIONAL).
3- Add a 3mm disk of DBS Positive Control, DBS Negative Control and dried blood spot collected on filter paper, previously perforated, in the determined wells.
4- Pipette 100 µL of Elution Buffer into all wells. **Including the Blank well**.
5- Gently homogenize for ± 30 seconds, cover the wells with plate sealer.
6- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 ºC ± 2 ºC.
7- After incubation, discard the contents of the wells by aspiration (Washer for filter paper technique). Use approximately 300 µL of **previously prepared** Wash Solution and perform a total of five (5) 5 second shake wash cycles. To guarantee the drying of the plate, at the end of the wash, tap the plate for a few seconds on absorbent paper.
Note: Poor washing/drying may cause poor results.
8- Pipette 100 µL of Conjugate into all wells. **Including the Blank well**.
9- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
10- Incubate for 30 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 ºC ± 2 ºC.
11- Remove the plate sealer from the wells.
12- Repeat item 7.
13- Pipette 100 µL of Substrate into all wells. **Including in the cavity of Blank**.
14- Gently homogenize for ± 30 seconds. Cover the wells with the plate sealer.
15- Incubate for 10 minutes ± 2 minutes in an incubator at 37 °C ± 2 °C.
16- Remove the plate sealer from the wells.
17- Pipette 100 µL of Stop Solution into all wells.
18- Gently homogenize for ± 30 seconds.
19- Read using a double filter: 450 nm / 630 nm in up to 15 minutes (maximum).

TECHNIQUE VERIFICATION

Verify if the results obtained by the reading of the Blank and Controls are compatible to the values below:

ITEM	ABSORBANCE
Blank	< 0.150
DBS Negative Control	< 0.150
DBS Positive Control	> 0.500

If the values are outside the expected values, the technique must be repeated.

CALCULATIONS

QUALITATIVE
Calculate Cut Off according to the formula below:
Cut Off = DBS Negative Control Mean Absorbance + 0.100.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
DBS Negative Control	0.020
	0.022
Cut Off = DBS Negative Control Mean Absorbance + 0.100	((0.020 + 0.022) / 2) + 0.100 = 0.120

Calculate the Index by dividing the absorbance of the sample by the Cut Off value.

Example:

ITEM	ABSORBANCE
Sample	1.352
Cut Off Value	0.120
Index = Sample/ Cut Off Value	1.352 / 0.120 = 11.27

Note: Data shown in examples is for illustration only and cannot be used for calculation of results.
Each laboratory must validate the Cut Off according to the instrumentation used and the researched population.

INTERPRETATION OF RESULTS

After calculating the index of the samples, consider the indices below to determine the results.

RESULTS	QUALITATIVE
	INDEX
Negative (No Reagent)	≤ 0.8
Undetermined	Between 0.8 and 1.2
Positive (Reagent)	≥ 1.2

Samples with an index greater than or equal to 1.2 are considered positive, samples with an index less than or equal to 0.8 are considered negative, and samples with an index between 0.8 and 1.2 are considered indeterminate. Thus, the sample mentioned in the example, whose absorbance was 1.352 and index 11.27, presents a positive result (index ≥ 1.2).

Notes: In case of indeterminate results, the sample must be reanalyzed in duplicate. Samples that give repeatedly indeterminate results should be retested using an alternate method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected in two weeks. The result of the last sample collected shall prevail. The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. Additional confirmatory tests must be included before a specimen is considered positive. A negative result does not exclude the possibility of exposure. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information, prior to making a descriptive diagnosis of the disease.
The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

PROCEDURE LIMITATIONS

The interpretation of a diagnostic test should not be based on a single test. All results must be interpreted in conjunction with other available clinical information prior to definitive diagnosis. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible medical professional, not being the only criterion for determining the diagnosis and/or treatment of the patient.

INTERFERENTS

No interference was observed for the concentrations of Triglycerides 1200 mg/dL, Acetylsalicylic Acid 20 mg/dL, Ascorbic Acid 2 g/dL, Creatine 200 mg/dL, Bilirubin 1 g/dL, Albumin 10 g/dL, Hemoglobin 1000 mg/dL dL, Oxalic Acid 60 mg/dL, Rheumatoid Factor 980 IU/mL, C-Reactive Protein 41.2 mg/dL and Anti-Streptolysin O 1023 IU/mL.

CROSS REACTIVITY

A cross-reactivity study was performed with 48 dried blood samples collected on filter paper negative for Toxoplasmosis IgM, but positive for other infections, in order to assess the possibility of cross-reactivity of these interferents in the result of BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS. Among them 5 samples positive for HTLV, 6 samples positive for Syphilis, 6 samples positive for HBsAg, 5 samples positive for HCV, 7 samples positive for Chagas Disease, 6 samples positive for Zika, 4 samples positive for CMV, 4 samples positive for Rubella and 5 HIV positive samples. No cross-reactivity was observed with positive samples for HTLV, Syphilis, HBsAg, HCV, Chagas Disease, Zika, CMV, Rubella and HIV. Despite the results found, the possibility of cross-reactivity cannot be completely ruled out. The final diagnosis must consider the patient's clinical data along with other laboratory data.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control program, where procedures, standards, limits and tolerance for variations are clearly established. It is important to point out that all measurement systems have a characteristic analytical variability, which must be monitored by the laboratories themselves. For that, it is recommended the use of controls, which allow evaluating the precision and accuracy of the dosages.

PRUDUCT PERFORMANCE

ACCURACY

Repeatability

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Repeatability	Sample		
	1	2	3
Average	1.3081	0.6429	0.0425
Standard Deviation	0.0480	0.0300	0.0027
Coefficient of Variation (%)	3.6667	4.6622	6.2990

Reproducibility

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 3 samples with different values, obtaining the following absorbance results:

Reproducibility	Sample		
	1	2	3
Average	1.2985	0.6553	0.0433
Standard Deviation	0.0597	0.0293	0.0030
Coefficient of Variation (%)	4.5930	4.4741	6.9427

CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS kit was used for the analysis of clinical samples previously characterized and confirmed by another reference enzyme-immunoassay method. The results show that the clinical sensitivity of the BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS kit is 98.82% and the clinical specificity is 98.98%.

		Reference Result		
		Positive	Negative	Total
BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS	Positive	84	1	85
	Negative	1	97	98
	Total	85	98	183

Clinical Sensitivity: 98.82% (84/85) CI 95% = 93.60 to 100%
Clinical Specificity: 98.98% (97/98) CI 95% = 94.40 to 100%

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Toxoplasma gondii is the causative agent of toxoplasmosis. It is an obligate intracellular protozoan that has been found in many species of birds, reptiles and mammals. The agent can be transmitted through organ transplantation, blood and leukocyte transfusions, contact with contaminated cat feces and ingestion of contaminated raw meat. In adults, the infection is usually benign or asymptomatic. However, symptomatic cases, including fatal cases, occur in immunosuppressed patients who have clinical or laboratory evidence of damage to the central nervous system. After infection, IgM antibodies appear within 5 days and have reduced levels within a few weeks or months. IgG antibodies usually appear 1 - 2 weeks after infection, reaching peak levels at 6 - 10 weeks and persisting for life. In children, the risk of fetal infection varies according to the time of pregnancy, when the mother is infected. In maternal infections that occur during the first trimester, the likelihood of the infection passing to the fetus is lower. However, if transmission occurs, serious outcomes such as miscarriage and hydrocephalus are more likely. Infections acquired later in pregnancy, where fetal transmissions occur more frequently, tend to be less severe, but they can still generate congenital manifestations, including brain calcifications and impaired learning.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Feldman, HA. Toxoplasmosis: An Overview. Acad. Med. (1974) 50:110-127.
2. Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult. Acad. Med. (1974) 50:211-227.
3. McLeod, R, and Remington JS. In Harrison.s Principles of Internal Medicine. (1980) 879-885.
4. Frenkel, JK. Toxoplasma in and Around Us. Bioscience. (1973) 23:343-352.
5. Feldman, HA. Epidemiology of Toxoplasma Infections, Epid. Rev. (1982) 4:204-213.
6. Krick, JA, and Remington, JS. Toxoplasmosis in the Adult – An Overview. N. Engl. J. Med. (1978) 298(10):550-553.
7. Bryan, RT, and Wilson, M. Toxoplasmosis. Lab Management (1988) 26:40-43.
8. TELELAB. Manual de Coleta de Sangue - Diagnóstico e Monitoramento das
DST, Aids e Hepatites Virais.
9. QUIBASA: Dados do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Phone: +55 31 3439.5454 | E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone.: 0800 0315454 | E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for BIOLISA TOXOPLASMOSIS IgM DBS kit: 10269360387

Review: October/2024

UNIVERSAL SYMBOLOGY