

## INSTRUÇÕES DE USO – TOXOPLASMOSE IGG

### Teste de ELISA para detecção de *Toxoplasma gondii* IgG – TG43

Teste de ELISA para determinação quantitativa de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii* em soro ou plasma humano.

Kit suficiente para 96 testes

#### SUMÁRIO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita protozoário intracelular obrigatório, provavelmente capaz de infectar todas as espécies de mamíferos, inclusive o homem. A detecção de anticorpos IgG contra o *T. gondii* é particularmente útil no diagnóstico de infecções crônicas de indivíduos em “risco”, associados a AIDS, transplante de órgãos e gravidez. A toxoplasmose adquirida é geralmente assintomática e benigna. No entanto, em mulheres grávidas a infecção adquire um significado especial, pois o parasita pode atingir a circulação fetal por via placentária e causar a toxoplasmose congênita. Em vários estudos têm-se demonstrado que o risco é mais alto e mais grave se a infecção ocorrer no primeiro trimestre da gravidez. As conseqüências da toxoplasmose congênita variam desde o aborto espontâneo e parto prematuro, até sintomas neurológicos e complicações oculares. As crianças com toxoplasmose congênita também podem permanecer assintomáticas durante várias semanas após o nascimento.

Ensaio altamente específico para IgG anti-Toxoplasma dão ao clínico um teste confiável para o monitoramento do risco de infecções na gravidez.

#### PRINCÍPIO

Microplacas são recobertas com antígenos do *T. gondii* inativados, que na 1ª incubação “capturam” especificamente as IgG presentes na amostra diluída.

Após lavar todos os outros componentes da amostra, na 2ª incubação as IgG anti-*T. gondii* ligadas são detectadas pela adição de anticorpos anti-IgG humanas, marcados com peroxidase.

A enzima capturada na fase sólida, agindo na mistura de substrato/cromógeno, gera um sinal óptico proporcional à quantidade de anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes na amostra.

**Tempo de Incubação:** 2 horas e 20 minutos

#### COMPONENTES DO KIT

- Reagentes suficientes para 96 determinações.
  - Conservar entre 2 a 8°C.
1. **MICROPLACA:** 1 placa com 12 tiras com 8 pocinhos recobertos com antígenos do *T. gondii*.  
**Pronta para uso**
  2. **DILUENTE DA AMOSTRA\*:** 100 mL, solução protéica tamponada com conservantes.  
**Pronto para uso.**

3. **PADRÕES DA CURVA\***: Soro humano, diluído em solução protéica tamponada, contendo anticorpos IgG específicos para *T. gondii* nas concentrações:

PADRÃO A: 0 UI/ml: 2 mL  
PADRÃO B: 10 UI/mL: 2 mL  
PADRÃO C: 20 UI/mL: 2 mL  
PADRÃO D: 50 UI/mL: 2 mL  
PADRÃO E: 100 UI/mL: 2 mL  
PADRÃO F: 200 UI/mL: 2 mL

**Prontos para uso**

**NOTA IMPORTANTE:**

Devido a padronização da curva de calibração deste kit em concordância à "2ª PREPARAÇÃO INTERNATIONAL (1980)" da WHO para *Toxoplasma gondii*, resultados diferentes serão obtidos quando comparados diretamente com outros kits que tenham utilizado a "3ª PREPARAÇÃO INTERNATIONAL (1994)".

Para maiores esclarecimentos consultar:

[www.who.int/biologicas/](http://www.who.int/biologicas/)

4. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM\*\***: 60 mL, solução tampão com conservantes.  
**Preparo**: Diluir 1 parte da solução concentrada para 19 partes (1+19) de água deionizada (exemplo: 10 mL+190 mL); volume total de 1200 mL.  
**Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C. Concentrada 20x**
5. **CONJUGADO\*\*\***: 0,750 mL, anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase, em solução tampão com estabilizantes e conservantes.  
**Preparo**: Para obter o conjugado diluído, diluir 1 parte do mesmo para 19 partes (1+19) de diluente do conjugado (exemplo: 1 mL + 19 mL). Preparar somente a quantidade a ser utilizada. Agitar em vórtex antes do uso.  
**Concentrado 20x**
6. **DILUENTE DO CONJUGADO\*\*\***: 15 mL, solução protéica tamponada com conservantes.  
**Pronto para uso.**
7. **SUBSTRATO**: 12 mL, solução tamponada de tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
**Pronto para uso**
8. **SOLUÇÃO DE PARADA**: 15 mL, Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M.  
**Pronta para uso**
9. **FOLHAS ADESIVAS**: 2 unidades
10. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

\* Contém 0,1% de azida sódica e 0,1% de Kathon GC

\*\* Contém 0,1% de timerosal

\*\*\* Contém 0,2% de gentamicina e 0,1% de Kathon GC

#### **ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO**

- Os reagentes e a microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade, determinada na etiqueta, se conservados entre 2 a 8 °C.
- Manter as tiras da microplaca não utilizadas na embalagem original fechada, protegidas da umidade e da luz (com o dessecante e lacrada). Depois de aberta estável por 4 semanas respeitadas as condições recomendadas de armazenamento.
- A solução de lavagem diluída é estável por uma semana se conservada de 2 a 8 °C.
- O conjugado diluído não é estável: diluir apenas o volume necessário à realização do ensaio.

#### **IMPORTANTE**

1. Não usar reagentes após o vencimento.
2. No procedimento de lavagem usar somente a SOLUÇÃO DE LAVAGEM 20X fornecida no kit e seguir cuidadosamente as recomendações da seção INSTRUÇÕES DE LAVAGEM.

#### **MATERIAL NÃO INCLUSO NO KIT**

- Micropipetas calibradas para 10, 100 e 1000 uL. Respectivas ponteiros descartáveis
- Misturador tipo vórtex e papel absorvente.
- Água Tipo I (deionizada)
- Cronômetro
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300uL
- Leitor de ELISA fotométrico com filtros a 450 nm e 620-630 nm

#### **PRECAUÇÕES DE USO**

**Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*.**

#### **"MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS"**

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos, conforme Procedimentos de manipulação de Amostras Biológicas do Laboratório de Análises.
- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar contaminação cruzada de reagentes e amostras.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados. Após procedimento de desinfecção, desprezar em pia com água em abundância.
- Resultados ótimos são obtidos através de rigorosa realização do teste conforme instruções dadas. Pipetagem precisa, incubação respeitando os limites de tempo e temperatura requerida é fundamental para o sucesso do teste.
- Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental. Maiores informações, consultar as

FISPQ's dos produtos obtidas pelo e-mail [btbiotec@biotec.com.br](mailto:btbiotec@biotec.com.br) ou pelo telefone (11) 5093.2288.

#### COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise.
- Evitar o uso de soros ou plasmas hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8°C por até 7 dias, ou congeladas a -20°C por até 6 meses. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez, pois as IgG podem ser danificadas.

#### PREPARAÇÃO DO TESTE

**1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (+20 a +25°C), e homogeneizar suavemente.**

2. Diluir cada amostra de soro/plasma a ser testado com diluente da amostra, na proporção de 1+101 (exemplo: 10 µL de amostra + 1 mL de diluente), homogeneizando bem, sem provocar a formação de espuma. **Os padrões da curva são prontos para uso.**

3. Montar protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e controles na placa onde será realizada a análise.

4. Deixar que a placa atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem plástica com dessecante, retirando o ar e fechando a embalagem hermeticamente.

#### Método Quantitativo

Seguir a orientação abaixo para dispensar os padrões da curva **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar dois poços para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1, B1
A	C1, D1
B	E1, F1
C	G1, H1
D	A2, B2
E	C2, D2
F	E2, F2
Amostras	a partir de G2

#### Método Qualitativo

Sugerimos a orientação para dispensar os seguintes padrões **SEMPRE EM DUPLICATA**, reservar um poço para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
A	B1, C1
B	D1, E1
F	F1
Amostras	a partir de G1

6. Preparar a solução de lavagem diluída adicionando 60 mL da solução 20x concentrada a 1140 mL de água destilada ou deionizada, para um volume total de 1200 mL (ou volume menor, sempre na proporção de 1+19). Armazenar a temperatura ambiente.

7. Diluir o CONJUGADO 20X na proporção de 1+19 usando o diluente do conjugado(exemplo: para um volume final de 1 mL misturar 50µL de conjugado 20X em 950µL de diluente de conjugado) . Preparar somente a quantidade a ser utilizada, pois a solução não é estável por longo período. Agitar em vórtex antes do uso.

#### **INSTRUÇÕES DE LAVAGEM**

Um bom procedimento de lavagem é essencial para obter-se dado analítico correto e preciso.

Recomendamos a utilização de uma lavadora de micropalcos de ELISA de boa qualidade, mantida no mais alto grau de performance de lavagem. Geralmente, 4-5 ciclos de lavagem são suficientes para evitar reações falso-positivas e coloração de fundo.

No caso de lavagem manual, sugerimos a realização de 5 ciclos, dispensando 300 µL/poço e aspirando o líquido 5 vezes.

Em qualquer um dos casos, o líquido aspirado tem que ser tratado com solução de hipoclorito de sódio a 5 % por 24 horas anterior ao descarte.

#### **REALIZAÇÃO DO TESTE**

1. Dispensar nos pocinhos apropriados, conforme protocolo de aplicação das amostras, montado pelo manipulador da análise no Laboratório de Análises Clínicas, 100 µL de cada padrão da curva e de cada amostra (sempre em duplicata), nos respectivos pocinhos das tiras. Deixar o pocinho A1 vazio para o branco. **Atenção:** **cobrir com folha adesiva e incubar por 1 hora a 37 °C.**

2. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

3. Dispensar 100 µL da solução de conjugado diluída em cada pocinho, exceto no pocinho A1 do branco. **Atenção:** **Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora a 37°C.**

4. Aspirar o conteúdo de todos os pocinhos e lavar 4 a 5 vezes com **300 µL da solução de lavagem diluída**. Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.

5. Dispensar 100 µL do cromógeno/substrato em todos os pocinhos inclusive no branco. Cobrir novamente e incubar por exatamente **20 minutos à temperatura ambiente** (+20 a +25°C), ao abrigo da luz.

**IMPORTANTE:** Amostras altamente positivas podem causar precipitação escura que não interfere no resultado do teste.

6. Adicionar 100 µL da solução de parada a todos os pocinhos (inclusive no branco), para interromper a reação.

7. Ler a absorbância a 450 nm com o leitor de ELISA dentro de no máximo 30 minutos. Usar o pocinho A1 como "branco" para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do "branco" de todos os valores medidos.

#### CONTROLE DE QUALIDADE

O teste executado é considerado **válido** desde que os seguintes critérios sejam observados:

DO450 nm do Branco	<b>&lt; 0,100</b>
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão A (0 UI/mL)	<b>&lt; 0,200</b>
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão F (200 UI/mL)	<b>&gt; 1,000</b>
Depois de descontado o branco, o valor médio da DO450 nm do Padrão B (10 UI/mL)	<b>&gt; Padrão A + 0,100</b>

#### CÁLCULO DOS RESULTADOS

Quando não for possível zerar o aparelho, descontar o valor da Absorbância do branco das demais Absorbâncias obtidas.

Calcular o **valor médio** dos padrões da curvas usando a fórmula a seguir:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

#### INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

##### Método quantitativo

Para obter resultados quantitativos em UI/mL, fazer um gráfico com os valores de Absorbância dos padrões (eixo vertical Y) contra a concentração correspondente (eixo horizontal X). Estabeleça a Curva Padrão através do ajuste da curva utilizando um programa estatístico qualificado ou papel milimetrado.

Os resultados em UI/mL para cada amostra são obtidos pela projeção da respectiva absorbância média sobre a Curva Padrão.

Para monitoramento da gravidez e de outros indivíduos em risco o **Cut Off (CO)** considerado é de **10 UI/mL (Padrão B)**. Assim:

Valores (médios) de Absorbância dos soros <b>acima de 10 UI/mL.</b>	<b>POSITIVO</b>
Valores (médios) de Absorbância dos soros <b>abaxio de 10 UI/mL.</b>	<b>NEGATIVO</b>

**IMPORTANTE:** Amostras muito reativas que apresentarem absorbâncias superiores ao último ponto da Curva Padrão devem ser determinados como: **> 200 UI/mL.**

##### Método qualitativo

Para obter resultados qualitativos, calcular a razão (VM/CO) entre a absorbância média de cada amostra (VM) e o valor do cutoff (CO).

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a seguinte tabela:

<b>VM/CO</b>	<b>Interpretação</b>
< 0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Indeterminado
> 1,1	Positivo

No caso de indeterminação repetir o teste posteriormente, em 2 a 4 semanas, com novas amostras.

#### **LIMITAÇÕES DO TESTE**

O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo.

Amostras lipêmicas, ictericas e hemolizadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas.

#### **PERFORMANCES**

##### **Sensibilidade**

A sensibilidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras positivas, testadas com um kit comercial de referência, e sob o Padrão Internacional da WHO para IgG e IgM de *Toxoplasma gondii*. O teste apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 10 UI/mL e um valor correlato maior de 98%.

##### **Especificidade**

A especificidade do ensaio foi calculada usando um painel de amostras negativas de soro e plasma testados com um kit comercial de referência. O teste apresenta sensibilidade maior de 99%.

##### **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade do ensaio foi calculada usando os controles 0 e 200 UI/mL testados em réplicas em diferentes dias. Um coeficiente de variação entre 4-12% foi obtido dependendo dos valores de OD 450nm.

#### **NOTA IMPORTANTE:**

Devido a padronização da curva de calibração deste kit em concordância à "2ª PREPARAÇÃO INTERNATIONAL (1980)" da WHO para *Toxoplasma gondii*, resultados diferentes serão obtidos quando comparados diretamente com outros kits que tenham utilizado a "3ª PREPARAÇÃO INTERNATIONAL (1994)".

Para maiores esclarecimentos consultar:

[www.who.int/biologicals](http://www.who.int/biologicals)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Engvall E & Perlmann P. J Immunochem 8: 871, 1971.

Engvall E & Perlmann P. J Immunol 109: 129, 1971.

Leinikki PO et al. J Clin Microbiol 8: 418, 1978.

Piroid E et al. Révue Méd Vet 131: 25, 1980.

<http://www.nibsc.ac.uk/catalog/standards/ifu/toxmifu.pdf>

<http://www.who.int/biologicals/>

[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_858.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_858.pdf)

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda**

CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (11) 5093.2288 – sac@btibiotec.com.br

Av. José Cândido da Silveira 2100 – sls 09, 10 e 18 - Horto

Cep: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil

**Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452**

**MS: 8004957.0083**