Instructions for Use

Toxoplasma gondii IgG ELISA

IVD

CE 0197

REF EIA-3519

Σ 96

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Utilize apenas a versão válida das Instruções de Utilização fornecidas com o kit.

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente : Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:	
Detailed editorial revision. Changed wording in several chapters. **Ausführliche redaktionelle Überarbeitung.** Geänderter Wortlaut in mehreren Kapiteln. **Revisione editoriale dettagliata.** Modificato il testo in diversi capitoli. **Revisión editorial detallada.** Se ha cambiado la redacción de algunos capítulos. **Révision éditoriale détaillée.** Modification de la formulation dans plusieurs chapitres. **Revisão editorial detalhada.** Texto alterado em vários capítulos.	
7.1 Validation of the Test Run	Added: "(OD $_{\text{Standard 1}}$ < OD $_{\text{Standard 2}}$ < OD $_{\text{Standard 3}}$)."
13 LITERATURE:	Addition of ref. # 7 to 10

ENGLISH 2
DEUTSCH.....12

LITERATURE.....21

SYMBOLS USED.....22

1 INTENDED USE

The **DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA** is a manual enzyme immunoassay for the **quantitative** and **qualitative** measurement of IgG-class antibodies to Toxoplasma gondii in human serum or plasma (EDTA, Li-heparin or citrate plasma).

For *in vitro* diagnostic use. For laboratory professional use.

1.1 Scientific Validity Report

Toxoplasma gondii is a small intracellular parasite, whose life cycle has a sexual and an asexual phase. Sexual development is restricted to the intestinal cells of (probably exclusively) cats; the oocysts formed are excreted and due to their resistant cell walls, they may be infectious under advantageous circumstances for at least 1 year. Animals and man are intermediate hosts for the asexual proliferation of T. gondii: the ingested parasites will proliferate explosively within the host cells lysing them eventually. They disseminate throughout the body via circulation and lymphatic system and may infect any cell type.

About half of the Toxoplasma infections process clinically unapparent. The other Toxoplasma infections show often only unspecific symptoms, after an incubation time from one to three weeks with lightly fever, exhaustion, headaches well as muscle and joint pain. Complications in the form of myocarditis, meningitis or pneumonia occur at 1% of infected children and young adults respectively. After recovery, Toxoplasma gondii cells persists in infected tissues by forming cysts which are resistant to the attacks of the immune system. In immunocompetent individuals the latent infection does not reactivate. After suppression of the immune system, activation of latent infections has been observed and can lead to severe complications.

An infection at any stage during pregnancy may result in the transplacental transmission of the parasite to the fetus although the timing of such a transfer does have an effect on the clinical outcome for the fetus.

1. Trimester: 17% → most often aborted, seldom severe damage to the unborn

2. Trimester: 24% → moderate or severe damage to the fetus

3. Trimester: 64% → mild damage or damage appears later in life

When maternal primary infection is detected and subsequently eradicated by chemotherapy, the risk for transmission to the fetus is decreased by about 75%. In AIDS patients, Toxoplasma encephalitis is of significant importance as the cause of death.

Interpretation of Results:

Negative results for Toxoplasma gondii IgG by ELISA indicate a lack of immunity but do not rule out completely an active infection. Consequently, an additional test for IgM antibodies is recommended.

Seronegative pregnant women should be tested in intervals of max. 12 weeks.

Detection of Toxoplasma gondii IgA as additional parameter does have additional, but no exclusive significance. At a detection of Toxoplasma gondii IgM, especially with simultaneous high or rising IgG concentration, the possibility of an acute first infection has to be considered. The detection of IgM in comparison with the detection of IgA delivers more certain decision between acute or latent infection. But the obtained result for IgA shows a very good additional decision support, if a suspicion for an acute infection occurs but no high IgM result is found.

Results should be interpreted according to the table below (Robert Koch Institute, Germany)

IgG	IgM	IgG-Avidity	Probable result
positive	negative	--------	Inactive, latent infection
positive	positive	high	Subsiding or latent (inactive) infection
positive	positive	low	Acute infection possible, therefore further clarification methods /clinical monitoring necessary

Infection may be identified by PCR, indirect immunofluorescence (IIF), Serology: detection of antibody production by ELISA.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA** Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter wells as a solid phase are coated with inactivated Toxoplasma gondii soluble antigen (strain RH).

Diluted patient specimens and **ready-for-use controls** are pipetted into these wells. During incubation Toxoplasma gondii-specific antibodies of positive specimens and controls are bound to the immobilized antigens.

After a washing step to remove unbound sample and control material horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG antibodies are dispensed into the wells. During a second incubation this anti-IgG conjugate binds specifically to IgG antibodies resulting in the formation of enzyme-linked immune complexes.

After a second washing step to remove unbound conjugate the immune complexes formed (in case of positive results) are detected by incubation with TMB substrate and development of a blue colour. The blue colour turns into yellow by stopping the enzymatic indicator reaction with sulfuric acid.

The intensity of this colour is directly proportional to the amount of Toxoplasma gondii-specific IgG antibody in the patient specimen. Optical density at 450 nm is read using an ELISA microtiter plate reader.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for *in vitro* diagnostic use only. For laboratory professional use only.
- Before starting the assay, read the instructions for use completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to interchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- Do not reuse microtiter wells.
- Reagents of other manufacturers must not be used together with the reagents of this test kit.
- All reagents in this kit are clear liquids, substrate solution is clear and colorless. Changes in its appearance may affect the performance of the test. In that case, contact DRG.
- Microbial contamination of reagents or samples may give false results.
- Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 25 °C) before starting the test. Temperature will affect the optical density readings of the assay.
- All indicated volumes must be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into original vials as reagent contamination may occur.

General Precautions

- Follow laboratory quality assurance and laboratory safety guidelines
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and samples with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink, or apply cosmetics in areas where samples or kit reagents are handled.
- Wear lab coats and disposable latex gloves when handling samples and reagents and where necessary safety glasses.

Biohazard Information

- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. However, no known test method can offer total assurance that no infectious agent is present.
- The device contains material of animal origin, which is certified apparently free of infectious or contagious diseases and injurious parasites.
- Bovine components originate from countries where BSE (Bovine spongiform encephalopathy) has not been reported.
- All materials and samples of human or animal origin must be handled as if capable of transmitting infectious diseases.
- Handling must be done in accordance with the procedures defined by appropriate national biohazard and safety guideline or regulation. Waste must be discarded according to local rules and regulations.

Information to Chemical Hazards and Hazard Classification

- Some reagents contain preservatives in non-declarable concentrations. Nevertheless, in case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- Substrate Solution contains an ingredient in non-declarable concentrations which causes serious eye irritation. In case of possible contact with eyes, rinse immediately carefully and thoroughly with eye wash or water. After contact with skin, wash with plenty of water. Take-off contaminated clothing and wash it before reuse.
- Avoid contact with Stop Solution containing < 2 % H_2SO_4. It may cause skin irritation and burns.
- Chemicals and prepared or used reagents must be treated as hazardous waste according to the national safety guideline or regulation.
- This product does not contain substances which have carcinogenic, mutagenic or toxic for reproduction (CMR) properties.

All reagents of this test kit do NOT contain hazardous substances in concentrations to be declared, a classification and labelling is not required.

For detailed information, please refer to the Safety Data Sheet, which is available upon request directly from DRG.

4 MATERIALS

4.1 Materials Provided with the Kit

Symbol	Quantity	Description	Preparation
Microtiterwells	12 x 8 wells (break apart)	**Microtiter plate** Wells coated with inactivated Toxoplasma gondii soluble antigen (strain RH).	Ready to use
Sample Diluent	1 x 100 mL	**Sample Diluent *** colored yellow, pH 7.2 ± 0.2	Ready to use
Standards (Standard 1 – 3)	3 x 1 vial, S1: 2 mL S2: 1 mL S3: 1 mL	**Standards *** *Calibrated against the following reference material: WHO International Standard 3rd IS for Anti-Toxoplasma Serum Ig (NIBSC code: TOXM)* Standard 1: 50 IU/mL, colored green, green cap. Standard 2: 100 IU/mL, colored blue, blue cap. Standard 3: 200 IU/mL, colored red, red cap.	Ready to use
Neg. Control	1 x 2 mL	**Negative Control *** Colored yellow, yellow cap.	Ready to use
Pos. Control	1 x 1 mL	**Positive Control** * colored purple, black cap.	Ready to use
Enzyme Conjugate	1 x 20 mL	**Enzyme Conjugate *** Colored red, antibody to human IgG conjugated to horseradish peroxidase.	Ready to use
Substrate Solution	1 x 14 mL	**Substrate Solution** Contains 3,3‘,5,5‘-tetramethylbenzidine (TMB). *Keep away from direct sun light.*	Ready to use
Stop Solution	1 x 14 mL	**Stop Solution** Contains < 2 % H_2SO_4. *Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.*	Ready to use
Wash Solution	1 x 30 mL	**Wash Solution, 20X concentrate ***	*See “Reagent Preparation“.*
	1 x	**Cover foil**	
	1 x	**Instructions for Use**	
	1 x	**Certificate of Analysis (CoA)**	
		* Contain(s) non-mercury preservative.	

4.2 Materials Required but Not Provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Incubator for 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiter plate wells
- Vortex tube mixer
- Absorbent paper
- Freshly distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage and Stability of the Kit

Unopened kits and reagents as well as **opened reagents** must be stored at 2 °C to 8 °C.

The microplate must always be stored in the resealable aluminum pouch containing a desiccant. Do not open the pouch until it has reached room temperature. The microtiter plate consists of 12 individual strips. Each strip can be divided into 8 individual wells.
Unused wells must be immediately returned to the aluminum pouch with the desiccant and stored again tightly resealed at 2 °C to 8 °C.

Once opened, reagent vials must be closed tightly again.

	Storage Temperature	Stability
Unopened kits and unopened reagents	2 °C to 8 °C	Until the expiration date printed on the label. Do not use reagents beyond this date!
Opened kit	2 °C to 8 °C	8 weeks

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature (RT, 20 °C to 25 °C) prior to use.

Wash Solution

Add fresh and germ-free distilled water to the 20X concentrated Wash Solution.
Dilute the complete content of the vial **1 + 19** (30 mL *Wash Solution* + 570 mL distilled water) to a final volume of 600 mL.
If crystals have formed in the wash solution concentrate, ensure that they are completely transferred and dissolved into the solution.
This diluted wash solution must have a pH value of 7.2 ± 0.2.

Stability after dilution:	at 2 °C to 8 °C	1 week

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any damage to the test kit or components, DRG must be informed in writing, at the latest one week after receiving the kit. Damaged single components must not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they must be disposed of according to the official regulations.

5 SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND PREPARATION

The following sample material can be used in this test:

Human serum or plasma (EDTA plasma, lithium heparin plasma or citrate plasma)

Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general, it should be avoided to use hemolytic, icteric, or lipemic samples. For further information refer to chapter "*Interfering Substances*".

5.1 Sample Collection

Serum: Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma: Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anticoagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

Whole blood should not be frozen before centrifugation.

5.2 Sample Storage

Samples must be stored tightly capped prior to performing the assay. If stored frozen, freeze only once. Thawed samples must be inverted several times prior to testing.

Stability	at 2 °C to 8 °C	5 days
	at -20 °C (in aliquots)	up to 18 months

5.3 Sample Preparation

Before starting the test, dilute each sample **1 + 100** with *Sample Diluent*,
e.g. 10 µL sample + 1 mL *Sample Diluent* **mix well, let stand for 15 minutes and mix well before use.**

Take **100 µL** of the prediluted sample for the ELISA. Use only fresh diluted samples!

For patients with concentrations greater than Standard 3 a second 1:10 dilution of this 1+100 diluted patient sample should be performed;
e.g. 30 µL of first sample dilution + 270 µL Sample Diluent (mix well).

Please note: Standards and Controls are ready to use and must not be diluted!

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 Procedural Notes

- All reagents and samples must be allowed to come to room temperature (20 °C to 25 °C) before use.
- All reagents must be mixed without foaming.
- Do not interchange caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control, or sample in order to avoid carry-over.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- Mix the contents of the microtiter plate wells thoroughly to ensure good test results.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Once the test has been started, all steps must be completed without interruption and in the same sequence for each step.
- The enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Respect the incubations times and temperatures as given in chapter "Test Procedure".
- Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- During the incubation at 37 °C cover microtiter strips with foil to avoid evaporation.
- **Important note to wash procedure:**
  Washing is critical. Improperly washed wells will give erroneous results. The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
- **Test performance using fully automated analysis devices:**
  Automated test performance using fully automated, open-system analysis devices is possible. However, the combination must be validated by the user.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

Before starting the assay, dilute *Wash Solution*, **prepare samples as described in section 5.3** and mix well before pipetting. For all standards/controls and samples carefully document the distribution on the plate on the Plate Layout Sheet supplied in the kit.

1. Secure the desired number of microtiter wells in the frame holder.

   Please allocate at least:
   1 well (e.g. A1) for the *Neg. Control*
   4 wells (e.g. B1 to E1) for the *Standard 1 – 3*
   1 well (e.g. F1) for the *Pos. Control*.

   It is left to the user to determine standards, controls and samples in duplicate.

2. Pipette
   100 µL of *Neg. Control* into well A1
   100 µL of *Standard* 1 into well B1 + C1
   100 µL of *Standard* 2 into well D1
   100 µL of *Standard* 3 into well E1
   100 µL of *Pos. Control* into well F1 and
   100 µL of each d i l u t e d sample <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.

3. Cover wells with the foil supplied in the kit. Incubate for **60 minutes at 37 °C**.

4. Wash the wells as follows:
   If the wash step is performed <u>manually</u>:
   Briskly shake out the contents of the wells.
   Rinse the wells **5 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well.

   If an <u>automated plate washer</u> is used:
   Rinse the wells **5 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well.

   <u>At the end of the washing step, always</u> strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets!

5. Pipette **100 µL *Enzyme Conjugate*** into each well.

6. Incubate for **30 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C)**.

7. Wash as described in step 4.

8. Pipette **100 µL** of ***Substrate Solution*** into each well.

9. Incubate for exactly **15 minutes at room temperature (20 °C to 25 °C) in the dark**.

10. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of ***Stop Solution*** to each well.
    Any blue color developed during the incubation turns into yellow.
    Note: Highly positive samples can cause dark precipitates of the chromogen!

11. Measure the optical density (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
    It is recommended that the wells be read **within 30 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Measurement

Measure the optical density (OD) of all wells **at 450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the Plate Layout Sheet.

<u>Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.</u>

Where applicable **calculate the mean OD values** of all duplicates.

7 RESULTS

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results must be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

7.1 Validation of the Test Run

The test run may be considered valid provided the following criteria are met:

***Neg. Control* in A1:**	OD value **lower than 0.200**
***Standard 1 (Cut-off)* in B1 + C1:**	OD value **between 0.350 – 0.850**
***Standard 2* in D1:**	OD value **between 0.750 – 1.500**
***Standard 3* in E1:**	OD value **between 1.000 – 2.000**
***Pos. Control* in F1:**	OD value **between 0.650 – 3.000**

($OD_{Standard\ 1} < OD_{Standard\ 2} < OD_{Standard\ 3}$).

7.2 Calculation of Quantitative Results

In order to obtain **quantitative results in IU/mL** plot the (mean) OD values of *Neg. Control* and *Standard 1, 2, and 3* on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 50, 100 and 200 IU/mL) and draw a standard calibration curve (OD values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) OD values of each patient specimen and control.

All validated computer programs can be used, that provide the following function: 4 PL (4 Parameter Logistics).

We use DRG regression program for Windows (4 parameter Rodbart regression).
If other regression software is used, the obtained values have to be validated by the user.

NOTE: *Values of additionally (1:10, in total 1:1000) diluted patient samples must be multiplied by the appropriate dilution factor in order to obtain correct results! (Dilution: 1:10 = Dilution factor: 10). (See chapter "5.3 Specimen Dilution").*

7.3 Interpretation of <u>quantitative</u> Results

The following values should be considered as a guideline:

Cut-off value: 50 IU/mL	**NEGATIVE:**	**< 45**	**IU/mL**
	GREY ZONE(equivocal):	**45 – 55**	**IU/mL**
	POSITIVE:	**> 55**	**IU/mL**

7.4 Calculation of <u>qualitative</u> Results

7.4.1 Calculation of Cut-off (CO)

Standard 1 is used as Cut-off!

Calculate the mean OD value of the duplicate determination of *Standard 1* (e.g. in B1/C1).

Example: $\frac{0.480 + 0.460}{2} = 0.470$ **= CO**

7.5 Interpretation of <u>qualitative</u> Results

NEGATIVE **Mean $OD_{patient} < OD_{CO} - 10\%$**

GREY ZONE **$OD_{CO} - 10\% \leq$ Mean $OD_{patient} \leq OD_{CO} + 10\%$**

Repeat test 2 - 4 weeks later - with new patient samples

Results in the second test again in the grey zone → NEGATIVE

POSITIVE **Mean $OD_{patient} > OD_{CO} + 10\%$**

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each standard curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day-to-day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the Quality Control Laboratory are stated in the Certificate of Analyses (CoA) added to the kit. The values and ranges stated on the CoA always refer to the current kit lot and must be used for direct comparison of the results.

If available, it is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Apply appropriate statistical methods for analyzing control values and trends. If the results of the assay do not agree with the established acceptable ranges of control materials, patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above-mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 3.45 – 200 IU/mL.

9.2 Specificity of Antigen

No cross reactivity was found for Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Schistosoma mansoni, Toxocara canis, Strongyloides and Echinococcus.

9.3 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean OD of 20 replicate analyses of the negative control and was found to be 3.45 IU/mL (OD_{450nm} 0.056).

9.4 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Diamed Eurogen ELISA with three lots of DRG ELISA, 125 samples, therefrom 59 negative samples are assayed.)

It is 98.3% (for all three DRG production lots).

9.5 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. (Detected by method comparison with Diamed Eurogen ELISA with three lots of DRG ELISA, 125 samples, therefrom 66 positive samples are assayed.)

It is 100% (for all three DRG production lots).

9.6 Method Comparison

The DRG ELISA was compared with another Toxoplasma gondii IgG ELISA (Diamed Eurogen). 125 serum samples are assayed.

		Other commercially available CE-marked ELISA	
		positive	negative
DRG ELISA	positive	66	1
	negative	0	58

Agreement: 99.20%

9.7 Reproducibility

9.7.1 Intra-assay

The intra-assay (within-run) precision of the DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA was determined by 20 measurements of 12 serum samples covering the hole measuring range.

Sample	Mean Conc. (IU/mL)	Intra-Assay CV (%)	n
1	17.93	9.8	20
2	33.80	5.2	20
3	26.25	7.9	20
4	53.29	6.3	20
5	55.21	4.6	20
6	65.34	3.2	20
7	95.23	5.9	20
8	100.15	6.0	20
9	97.82	8.0	20
10	118.89	5.8	20
11	196.32	6.7	20
12	193.35	4.8	20

9.7.2 Inter-assay

The inter-assay variation of the DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA was determined with 3 samples with 2 production kits in 10 independent runs with 2 replicates per run.

Sample	Mean Conc. (IU/mL)	Inter-Assay CV (%)	n
1	112.02	6.8	40
2	138.63	5.8	40
3	211.45	5.0	40

9.8 Recovery

Samples have been spiked by adding 3 solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.

The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous value + added value) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (IU/mL)		27.00	32.14	37.99
Average Recovery (%)		96.0	97.5	94.2
Range of Recovery (%)	**from**	87.0	88.9	85.0
	to	101.6	104.4	100.7

9.9 Linearity

Three samples (serum) containing different amounts of analyte were serially diluted with sample diluent and assayed with the DRG ELISA. The percentage recovery was calculated by comparing the expected and measured values for the analyte.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (IU/mL)		200.00	280.00	403.00
Average Recovery (%)		103.6	95.9	103.2
Range of Recovery (%)	**from**	99.3	88.8	96.6
	to	106.8	103.9	112.0

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the instructions for use and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the samples may affect the optical density values.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

11.1 Interfering Substances

Hemoglobin (up to 4.0 mg/mL), bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and triglyceride (up to 30.0 mg/mL) have no influence on the assay results.

12 LEGAL ASPECTS

12.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover, the user must strictly adhere to the laboratory quality assurance guidelines and applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.
The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. If there is any doubt or concern regarding a result, please contact DRG.

12.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

12.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12.4 Reporting of Serious Incident

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA** ein manueller Enzymimmunoassay zur **quantitativen und qualitativen** Messung von IgG Antikörpern gegen Toxoplasma gondii in humanem Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma).

Für den Einsatz in der *In-vitro* Diagnostik. Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

1.1 Klinische Bedeutung

Toxoplasma gondii ist ein kleiner intrazellulär Parasit, dessen Lebenszyklus in eine sexuelle und eine asexuelle Phase unterschieden werden kann. Die sexuelle Entwicklung ist auf die Intestinalzellen beschränkt (wahrscheinlich ausschließlich bei Katzen). Die gebildeten Oozysten werden ausgeschieden und aufgrund ihrer widerstandsfähigen Zellwände können sie unter günstigen Umständen für ein Jahr infektiös bleiben. Tier und Mensch sind Zwischenwirte für die asexuelle Vermehrung von T. gondii: Die aufgenommenen Parasiten vermehren sich explosionsartig und eventuell lysieren sie die Wirtszellen. Über Blutkreislauf und Lymphsystem verbreiten sie sich im Körper und können jeden beliebigen Zelltyp infizieren. Etwa die Hälfte der Toxoplasmoseinfektionen verlaufen klinisch inapparent. Bei den übrigen Toxoplasmosen treten oftmals lediglich unspezifische Symptome auf, die sich nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Wochen in leichtem Fieber, Mattigkeit, Stirnkopfschmerzen, sowie Muskel- und Gelenkschmerzen äußern. Komplikationen in Form von Myokarditis, Meningitis oder Pneumoniie, treten bei 1% der infizierten Kinder bzw. junger Erwachsener auf. Nach Überwindung der aktiven Phase der Infektion verbleiben die Toxoplasmen in den infizierten Geweben, in Zysten eingeschlossen, zurück. In der Regel wird diese latente Infektion beim immunkompetenten Wirt nicht reaktiviert. Bei Immunsupprimierten Patienten verursacht Toxoplasmose schwere Komplikationen durch Reaktivierung einer latenten früheren Infektion. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann zu einer transplazentaren Übertragung der Toxoplasmen führen. Die Folgen für Neugeborene sind unterschiedlich ausgeprägt:

1. Trimester: 17% meistens Abort, seltener schwere Schäden des Neugeborenen

2. Trimester: 24% mittlere bis schwere Schäden des Neugeborenen

3. Trimester: 64% nur leichte Schäden, bzw. Spätschäden

Wird unmittelbar nach dem Erkennen einer mütterlichen Primärinfektion therapiert, kann das Infektionsrisiko für den Fetus um 75% verringert werden. Große Bedeutung hat die Toxoplasmose-Enzephalitis bei AIDS Patienten, da diese Erkrankung häufig die alleinige Todesursache bei dieser Patientengruppe darstellt.

Interpretation der Ergebnisse:

Ein negatives Ergebnis für Toxoplasma gondii IgG zeigt, dass keine Immunität erworben wurde, schließt aber eine akute Infektion nicht gänzlich aus. Die zusätzliche Untersuchung auf Toxoplasma gondii IgM-Antikörper ist daher sinnvoll. Seronegative Schwangere sollten generell im Intervall von maximal 12 Wochen getestet werden. Spezifisches IgA als zusätzlicher Parameter hat sicherlich nur additive, nicht aber ausschließende Aussagekraft. Bei einem Nachweis von Toxoplasma gondii IgM-Antikörpern, besonders bei gleichzeitig hoher oder ansteigender IgG-Konzentration, muss die Möglichkeit einer akuten Erstinfektion in Betracht gezogen werden. Die Höhe des IgM-Titers hat sich gegenüber der Höhe des IgA-Titers als der eindeutig zuverlässigere Parameter für eine Unterscheidung zwischen akuter und latenter Infektion erwiesen. Der im IgA-Test erhobene Befund stellt aber eine sehr gute zusätzliche Entscheidungshilfe dar, wenn der Verdacht auf eine Akutinfektion zwar gegeben ist, aber keine hohen IgM-Titer feststellbar sind.

Die Ergebnisse sollten entsprechend der folgenden Tabelle (Robert Koch Institut) beurteilt werden.

IgG	*IgM*	*IgG-Avidität*	*Wahrscheinliches Ergebnis*
positiv	negativ	--------	Inaktive, latente Infektion
positiv	positiv	hoch	Abklingende oder latente (inaktive) Infektion
positiv	positiv	gering	Akute Infektion möglich, deshalb sind weitere Abklärungsverfahren bzw. Verlaufskontrollen erforderlich

Die Infektion kann mittels PCR, indirekter Immunfluoreszenz (IIF) oder in der Serologie mittels Nachweis von Antikörpern (ELISA) identifiziert werden.

2 TESTPRINZIP

Der **DRG Toxoplasma gondii IgG ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay.

Vertiefungen einer Mikrotiterplatte als Festphase sind mit inaktiviertem Toxoplasma gondii soluble Antigen (Strain RH) beschichtet.

In diese Vertiefungen werden **verdünnte** Patientenproben und **gebrauchsfertige** Kontrollen pipettiert. Während der darauf folgenden Inkubation werden Toxoplasma gondii-spezifische Antikörper positiver Proben und Kontrollen an die immobilisierten Antigene gebunden.

Nach einem Waschvorgang zur Entfernung von nicht gebundenem Kontroll- und Probenmaterial wird Anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das sich während einer weiteren Inkubation spezifisch an IgG-Antikörper bindet und dadurch zur Bildung enzymmarkierter Immunkomplexe führt.

Durch einen zweiten Waschvorgang wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die (bei positiven Resultaten) gebildeten Immunkomplexe werden durch Inkubation mit TMB-Substrat anhand einer blauen Farbreaktion, die nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure in gelb umschlägt, sicht- und messbar gemacht.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist der Anti-Toxoplasma gondii-IgG-Antikörpermenge in der Patientenprobe direkt proportional. Die Messung der optischen Dichte bei 450 nm erfolgt mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ELISA-Reader).

3 WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch in Laboratorien.
- Bevor Sie mit dem Test beginnen, lesen Sie die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig durch. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass Sie alles verstanden haben.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Vertiefungen verschiedener Platten, auch aus derselben Charge, sollten nicht untereinander ausgetauscht werden. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen transportiert oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leichte Unterschiede aufweisen kann.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Mikrotitervertiefungen nicht wiederverwenden.
- Reagenzien anderer Hersteller dürfen nicht zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Alle Reagenzien dieses Kits sind klare Lösungen, die Substratlösung ist klar und farblos. Veränderungen des Aussehens können die Durchführung des Tests beeinträchtigen. In diesem Fall wenden Sie sich bitte an DRG.
- Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Geben Sie keine Reagenzien zurück in die Originalfläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.

Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

- Befolgen Sie die Richtlinien zur Qualitätssicherung und zur Sicherheit im Labor.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen mit Kitbestandteilen oder Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen, trinken oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborkittel und Einweg-Latexhandschuhe sowie, falls erforderlich, eine Schutzbrille zu tragen.

Informationen zur biologischen Gefährdung

- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt Kein bekanntes Testverfahren kann jedoch mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass kein Infektionserreger vorhanden ist.
- Das Produkt enthält Material tierischen Ursprungs, das nachweislich frei von infektiösen oder ansteckenden Krankheiten und schädigenden Parasiten ist.
- Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen keine BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) gemeldet wurde.
- Alle Materialien und Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen so behandelt werden, als ob sie ansteckende Krankheiten übertragen könnten.
- Die Handhabung muss in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in den entsprechenden nationalen Richtlinien oder Vorschriften für Biogefährdung und Sicherheit festgelegt sind. Abfälle müssen gemäß den lokalen Regeln und Vorschriften entsorgt werden.

Informationen zu chemischen Gefahren und zur Gefahreneinstufung

- Einige Reagenzien enthalten Konservierungsmittel in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentrationen. Bei Kontakt der Reagenzien mit den Augen oder der Haut dennoch sofort mit ausreichend Wasser spülen.

- Die Substratlösung enthält einen Inhaltsstoff in nicht kennzeichnungspflichtiger Konzentration, der schwere Augenreizungen verursacht. Bei möglichem Kontakt mit den Augen sofort sorgfältig und gründlich mit Augenspülung oder Wasser spülen. Bei Berührung mit der Haut mit reichlich Wasser abwaschen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) vermeiden, da sie < 2 % H_2SO_4 enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und -verätzungen verursachen.
- Chemikalien und zubereitete oder gebrauchte Reagenzien müssen als gefährlicher Abfall gemäß den nationalen Sicherheitsrichtlinien oder -vorschriften behandelt werden.
- Dieses Produkt enthält keine Stoffe, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Eigenschaften (CMR) haben.

Alle Reagenzien dieses Testkits enthalten KEINE gefährlichen Stoffe in deklarationspflichtigen Konzentrationen, eine Einstufung und Kennzeichnung ist nicht erforderlich.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt, das Sie auf Anfrage direkt bei DRG erhalten.

4 MATERIALIEN

4.1 Im Kit mitgelieferte Materialien

Symbol	Anzahl/Menge	Beschreibung	Vorbereitung
Microtiterwells	12 x 8 Wells (einzeln brechbar))	**Mikrotiterplatte** Vertiefungen beschichtet mit Toxoplasma gondii soluble Antigen (Strain RH).	Gebrauchsfertig
Sample Diluent	1 x 100 mL	**Probenverdünnungsmedium *** Gelb gefärbt, pH 7.2 ± 0.2	Gebrauchsfertig
Standards (Standard 1 – 3)	3 x 1 Fläschchen, S1: 2 mL S2: 1 mL S3: 1 mL	**Standards *** Kalibriert gegen folgendes Referenzmaterial: *WHO International Standard 3rd IS for Anti-Toxoplasma Serum Ig (NIBSC code: TOXM)* Standard 1: 50 IU/mL, grün gefärbt, grüne Kappe. Standard 2: 100 IU/mL, blau gefärbt, blaue Kappe. Standard 3: 200 IU/mL, rot gefärbt, rote Kappe.	Gebrauchsfertig
Neg. Control	1 x 2 mL	**Negative Kontrolle *** Gelb gefärbt, gelbe Kappe.	Gebrauchsfertig
Pos. Control	1 x 1 mL	**Positive Kontrolle** * Violet gefärbt, schwarze Kappe.	Gebrauchsfertig
Enzyme Conjugate	1 Fläschchen, 20 mL	**Enzymkonjugat *** Rot gefärbt, Antikörper gegen humanes IgG, konjugiert mit Meerrettichperoxidase.	Gebrauchsfertig
Substrate Solution	1 Fläschchen, 14 mL	**Substratlösung** Enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). *Von direktem Sonnenlicht fernhalten.*	Gebrauchsfertig
Stop Solution	1 Fläschchen, 14 mL	**Stopplösung** Enthält 2 % H_2SO_4, *Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.*	Gebrauchsfertig
Wash Solution	1 x 30 mL	**Waschlösung, 20X-Konzentrat ***	*Siehe "Vorbereitung der Reagenzien".*
	1 x	**Abdeckfolie**	
	1 x	**Gebrauchsanweisung**	
	1 x	**Certificate of Analysis (CoA)** (Analysenzertifikat)	
		***** Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.	

4.2 Erforderliche, aber nicht enthaltene Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Inkubator für 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer für Röhrchen
- Saugfähiges Papier
- Frisches destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Ungeöffnete Kits und Reagenzien sowie **geöffnete Reagenzien** müssen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterplatte muss immer in dem wiederverschließbaren Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittel enthält, gelagert werden. Öffnen Sie den Beutel erst, wenn er Raumtemperatur erreicht hat. Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 einzelnen Streifen. Jeder Streifen kann in 8 einzelne Kavitäten (Wells) unterteilt werden. Nicht benötigte Kavitäten müssen sofort in den Aluminiumbeutel mit dem Trockenmittel zurückgegeben und wieder dicht verschlossenen bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Einmal geöffnete Reagenzfläschchen müssen wieder fest verschlossen werden.

	Lagerungstemperatur	**Stabilität**
Ungeöffneter Kit und ungeöffnete Reagenzien	2 °C bis 8 °C	Bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum. Reagenzien nach Ablauf dieses Datums nicht mehr verwenden!
Geöffneter Kit	2 °C bis 8 °C	8 Wochen

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und die benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) bringen.

Wash Solution

Fügen Sie der 20-fach konzentrierten Waschlösung frisches und keimfreies destilliertes Wasser hinzu.

Den gesamten Inhalt des Fläschchens **1 + 19** (30 mL *Wash Solution* + 570 mL destilliertes Wasser) auf ein Endvolumen von 600 mL verdünnen.

Falls sich in dem Waschlösungskonzentrat Kristalle gebildet haben, stellen Sie sicher, dass diese vollständig in die Lösung überführt und aufgelöst werden.

Diese verdünnte Waschlösung muss einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2 haben.

Stabilität nach Verdünnung:	bei 2 °C bis 8 °C	1 Woche

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits und aller verwendeten Materialien / Reagenzien muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Beschädigte Einzelkomponenten dürfen nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen aufbewahrt werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 ENTNAHME, LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Das folgende Probenmaterial kann in diesem Test eingesetzt werden:

Humanes Serum oder Plasma (EDTA-, Lithium-Heparin- oder Zitratplasma)

Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

5.1 Probenentnahme

Serum: Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma: Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanz enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

Vollblut sollte vor der Zentrifugation nicht eingefroren werden.

5.2 Probenlagerung

Die Proben müssen bis zur Durchführung des Tests fest verschlossen aufbewahrt werden. Wenn sie gefroren gelagert werden, nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben müssen vor dem Test mehrmals geschwenkt werden.

Stabilität:	bei 2 °C bis 8 °C	5 Tage
	bei -20 °C (in Aliquoten)	bis zu 18 Monate

5.3 Probenvorbereitung

Vor Testbeginn muss jede Probe **1 + 100** mit *Sample Diluent* verdünnt werden;

z.B. 10 µL Probe + 1 mL *Sample Diluent,* **gut mischen, 15 Minuten stehen lassen, nochmals gut mischen.**

Nehmen Sie **100 µL** der vorverdünnten Probe für den ELISA. Verwenden Sie nur frische verdünnte Proben!

Proben mit IgG-Konzentration oberhalb der Konzentration von Standard 3 sollten nach der oben beschriebenen Verdünnung 1:10 weiter verdünnt werden,
z.B. 20 µL der ersten Probenverdünnung + 180 µL Sample Diluent (gut mischen).

Achtung: Standards und Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Hinweise zur Durchführung

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.
- Alle Reagenzien müssen ohne Schaumbildung gemischt werden.
- Die Kappen der Reagenzfläschchen dürfen nicht vertauscht werden, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Einweg-Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten.
- Kavitäten während der Testdurchführung nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschritts hinzufügen.
- Sobald der Test begonnen wurde, müssen alle Schritte ohne Unterbrechung und in der gleichen Reihenfolge für jeden Schritt abgeschlossen werden.
- Die enzymatische Reaktion ist linear proportional zu Zeit und Temperatur.
- Die optische Dichte ist eine Funktion der Inkubationszeit und -temperatur. Die in Kapitel "Testverfahren" angegebenen Inkubationszeiten und -temperaturen müssen eingehalten werden.
- Es wird empfohlen, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen, usw. Nur eine solche Vorbereitung garantiert für jeden Pipettierschritt gleiche Zeiten ohne Unterbrechung.
- Während der Inkubation bei 37 °C die Mikrotiterstreifen mit Folie abdecken, um Verdunstung zu vermeiden.
- **Wichtiger Hinweis zum Waschvorgang:**
  Das Waschen ist entscheidend. Unsachgemäß gewaschene Kavitäten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrittes!

- **Testdurchführung mit vollautomatischen Analysegeräten:**
  Eine automatisierte Testdurchführung mit vollautomatischen, systemoffenen Analysegeräten ist möglich. Die Kombination muss jedoch vom Anwender validiert werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve enthalten.

Vor Beginn der Testdurchführung die Waschlösung verdünnen, **die Proben wie in Abschnitt 5.3 beschrieben vorbereiten** und vor dem Pipettieren gut mischen. Dokumentieren Sie für alle Standards/Kontrollen und Proben sorgfältig die Verteilung auf der Platte auf dem im Kit enthaltenen Plattenlayoutblatt.

1. Die benötigte Anzahl der Mikrotiter-Wells in der Halterung befestigen.

   Mindestens
   1 Vertiefung (z.B. A1) für *Neg. Control*
   4 Vertiefungen (z.B. B1 to E1) für *Standard 1 - 3*
   1 Vertiefung (z.B. F1) für *Pos. Control*.

   Es bleibt dem Anwender überlassen, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung durchzuführen.

2. Pipettieren Sie
   Pipettieren Sie
   100 µL *Neg. Control* in Vertiefung A1
   100 µL *Standard* 1 in die Vertiefungen B1 + C1
   100 µL *Standard* 2 in Vertiefung D1
   100 µL *Standard* 3 in Vertiefung E1
   100 µL *Pos. Control* in Vertiefung F1 und
   100 µL jeder v e r d ü n n t e n Probe mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells.

3. Vertiefungen mit der im Kit enthaltenen Folie abdecken. Für **60 Minuten bei 37 °C** inkubieren.

4. Die Vertiefungen folgendermaßen waschen:
   Wenn der Waschschritt manuell durchgeführt wird:
   Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
   Wells **5-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

   Bei Verwendung eines Waschautomaten:
   Wells **5-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* pro Well waschen.

   Am Ende des Waschschritts die Vertiefungen immer kräftig auf saugfähigem Papier ausklopfen, um verbliebene Flüssigkeit zu entfernen.

5. **100 µL *Enzyme Conjugate*** in jedes Well zugeben.

6. **30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C to 25 °C)** inkubieren.

7. Waschen, wie in Schritt 4 beschrieben.

8. **100 µL *Substrate Solution*** in jedes Well pipettieren.

9. Exakt **15 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C to 25 °C) im Dunkeln** inkubieren.

10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL *Stop Solution*** in jedes Well abstoppen.
    Jede blaue Farbe, die sich während der Inkubation entwickelt hat, schlägt in Gelb um.
    Hinweis: Stark positive Proben können dunkle Präzipitate des Chromogens verursachen!

11. Die Optische Dichte (OD) der Lösung in jedem Well bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser bestimmen.
    Es wird empfohlen, die Vertiefungen **innerhalb von 30 Minuten** nach Zugabe der Stopplösung abzulesen.

6.3 Messung

Die optische Dichte (OD) aller Vertiefungen bei 450 nm messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in den Übersichtsplan eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der OD berechnen.

7 ERGEBNISSE

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

7.1 Qualitätskontrollkriterien und Testvalidität

Der Testlauf kann als gültig angesehen werden, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

***Neg. Control* in A1:**	OD-Wert **kleiner als 0,200**
***Standard 1 (Cut-off)* in B1 + C1:**	OD-Wert **zwischen 0,350 – 0,850**
***Standard 2* in D1:**	OD-Wert **zwischen 0,750 – 1,500**
***Standard 3* in E1:**	OD-Wert **zwischen 1,000 – 2,000**
***Pos. Control* in F1:**	OD-Wert **zwischen 0,650 – 3,000**

($OD_{Standard\ 1} < OD_{Standard\ 2} < OD_{Standard\ 3}$).

7.2 Messwertberechnung der quantitativen Ergebnisse

Um **quantitative Ergebnisse in IU/mL** zu erhalten, die OD-Werte von *Neg. Control* und *Standard 1, 2 und 3* gegen ihre entsprechende Konzentration (0, 50, 100, 200 IU/mL) auftragen und eine Standardkurve erstellen (OD-Werte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve die gemittelten OD-Werte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Es können alle validierten Computerprogramme verwendet werden, die folgende Funktion bieten: 4 PL (4 Parameter Logistics).

DRG verwendet das DRG-Regressionsprogramm für Windows (4 Parameter Rodbart Regression).
Wird eine andere Regressionssoftware verwendet, müssen die Ergebnisse durch den Anwender validiert werden.

Achtung: *Die Werte von zusätzlich (z.B. 1:10, insgesamt 1:1000) verdünnten Proben müssen nach dem Ablesen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden! (Verdünnung 1:10; Verdünnungsfaktor: 10)*

7.3 Interpretation der quantitativen Ergebnisse

Die folgenden Werte sind als Richtwerte zu betrachten:

Cut-off value: 50 IU/mL	**NEGATIV:**	**< 45**	**IU/mL**
	GRAUZONE(equivocal):	**45 – 55**	**IU/mL**
	POSITIV:	**> 55**	**IU/mL**

7.4 Qualitative Testauswertung

7.4.1 Berechnung des Cut-off [CO]

Standard 1 wird als Cut-off eingesetzt!

Berechnen Sie den OD-Mittelwert der Doppelbestimmung des Standards 1 (z. B. in B1/C1).

Beispiel: $\frac{0{,}480 + 0{,}460}{2} = 0{,}470$ **= CO**

7.5 Interpretation qualitativer Ergebnisse

NEGATIV	**Mittlere $OD_{Patient} < OD_{CO} - 10\%$**
GRAUZONE	**$OD_{CO} - 10\% \leq$ mittlere $OD_{Patient} \leq OD_{CO} + 10\%$** Test 2 - 4 Wochen später wiederholen - mit frischer Patientenprobe. Ergebnisse im zweiten Test wieder in der Grauzone ⇒ **NEGATIV**
POSITIV	**Mittlere $OD_{Patient} > OD_{CO} + 10\%$**

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Eine gute Qualitätssicherung im Labor erfordert, dass mit jeder Standardkurve Kontrollen mitgeführt werden. Eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollen sollte gemessen werden, um Mittelwerte und Akzeptanzbereiche zu ermitteln und damit eine korrekte Testdurchführung zu gewährleisten.

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag-Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im Analysenzertifikat (CoA), das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im CoA angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollen zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Falls verfügbar, wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungsprogrammen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontrollwerten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdaten der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keine Fehler erkennbar sein, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 LEISTUNGSMERKMALE

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 3,45 – 200 IU/mL.

9.2 Spezifität des Antigens (Kreuzreaktivität)

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Schistosoma mansoni, Toxocara canis, Strongyloides und Echinococcus festgestellt.

9.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert der OD plus der zweifachen Standardabweichung der neg. Kontrolle (n = 20), beträgt 3,45 IU/mL (OD_{450nm} 0,056).

9.4 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch Vergleich mit Diamed Eurogen Toxoplasma gondii IgG ELISA über 3 DRG-Produktionschargen mit 125 Proben, davon 59 negative.)

Sie beträgt 98,3% für alle drei DRG-Produktionschargen.

9.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. (Ermittelt durch Vergleich mit Diamed Eurogen Toxoplasma gondii IgG ELISA über 3 DRG-Produktionschargen mit 125 Proben, davon 66 positive.)

Sie beträgt 100% für alle drei DRG-Produktionschargen.

Die Daten zu:

9.6 Methodenvergleich

9.7 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.8 Wiederfindung

9.9 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Gebrauchsanweisung und unter Einhaltung der Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Handhabung der Proben oder eine Modifikation dieses Tests kann die Ergebnisse beeinflussen.

Eine bakterielle Kontamination oder wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen der Proben können die Werte der optischen Dichte beeinflussen.

Bei immungeschwächten Patienten und Neugeborenen haben serologische Daten nur begrenzten Wert.

11.1 Störsubstanzen

Hämoglobin (bis zu 4,0 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30,0 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

12 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

12.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Anwender die Richtlinien zur Qualitätssicherung im Labor und anwendbare nationale Normen und/oder Gesetze strikt einhalten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitzuführen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen.

Wenn bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken bestehen, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

12.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

12.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12.4 Meldung von schwerwiegenden Vorkommnissen

Jedes schwerwiegende Vorkommnis im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

13 LITERATURE

1. P. Cassinotti, Human Toxoplasma gondii infections and their diagnosis
   Alpe Adria Microbiologiy Journal 1995, 4, 235-246.
2. M. Schleuning, Toxoplasma gondii Infektionen
   Deutsches Ärzteblatt 93, Heft 43, (Oktober 1996), B2182-B2185.
3. NCCLS. Clinical Use and Intrepretation of Serologic Tests for *Toxoplasma gondii*; Approved Guideline.
   NCCLS document M36-A [ISBN 1-56238-523-2]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 2004.
4. Wilson M, Jones JL, McAuley JM. *Toxoplasma*.
   In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 2003. p. 1970-1980.
5. Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis.
   In: Remington JS, Klein JO, editors. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 5th ed. Philadelphia, PA: The WB Saunders Co.; 2001. p. 205-346.
6. Robert-Koch-Institut (2009) Toxoplasmose, RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte.
7. Ybañez RHD, Ybanez AP and Nishikawa Y. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans.
   Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10: 204.
8. Nayeri T et al. The global seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women who had spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis
   PLoS Negl Trop Dis. Published online 2020 Mar 13.
9. Dasa TT et al. Toxoplasmosis infection among pregnant women in Africa: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2021; 16(7), 1-14.
10. Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F: Toxoplasmosis in Germany—epidemiology, diagnosis, risk factors, and treatment.
    Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 435–44.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français	Português
CE	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes	Conformidade Europeia
	Consult instructions for use *	Gebrauchsan-weisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter la notice d'utilisation	Consultar as instruções de uso
IVD	*In vitro* diagnostic medical device *	*In-vitro-* Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
REF	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence	Número de catálogo
LOT	Batch code *	Fertigungslosnumm er, Charge *	Lotto no	Número de lote	No. de lot	Código do lote
Σ	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> determinações
	Temperature limit *	Temperatur-begrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation	Limites de temperatura
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation	Prazo de validade
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant	Fabricante
	Date of Manufacture *	Herstellungsdatum *	Data di produzione	Fecha de fabricación	Date de production	Data de fabricação
	Biological risks *	Biologische Risiken *	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques	Riscos biológicos
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention	Cuidado
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches	
Distributed by	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur	Distribuidor
Content	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement	Conteúdo
Volume/No.	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité	Volume / Quantidade
Microtiterwells	Microtiter plate	Mikrotiterplatte	Piastra per microtitolazione	Placa de microtítulo	Microplaque	Placa de microtitulação
Enzyme Conjugate	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Coniugato enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique	Conjugado Enzimático
Substrate Solution	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution de substrat	Solução de Substrato
Stop Solution	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d´ arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt	Solução de Paragem
Standard	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard	Padrão
Control	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle	Controlo
Pos. Control	Positive Control	Positive Kontrolle	Controllo positivo	Control positivo	Positif Contrôle	
Neg. Control	Negative Control	Negative Kontrolle	Controllo negativo	Control negativo	Négatif Contrôle	
Cut-off Control	Cut-off Control	Grenzwert-Kontrolle	Controllo valore limite	Control valor limite	Valeur limite Contrôle	
Wash Solution	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage	Solução de Lavagem
Sample Diluent	Sample Diluent	Probenver-dünnungsmedium	Diluente per campioni	Diluyente de muestras	Diluant d'échantillon	Diluente de Amostra
Conjugate Diluent	Conjugate Diluent	Konjugatver-dünnungsmedium	Diluente coniugato	Diluyente de conjugados	Diluant de conjugué	Diluente de Conjugado