

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	2
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	2
4. СОСТАВ НАБОРА	3
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	4
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	4
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	5
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	6
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА G (IgG) К *TOXOPLASMA GONDII* В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ КОШАЧЬИХ И СОБАЧЬИХ «Токсоплазма IgG-КС-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» предназначен для качественного определения концентрации антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в сыворотке (плазме) крови кошачьих и собачьих методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Токсоплазмоз является широко распространенным инфекционным заболеванием, вызываемым внутриклеточным паразитом *Toxoplasma gondii*, способным инфицировать все виды млекопитающих. Домашние животные (собаки и кошки) могут переносить данное заболевание человеку. Острый токсоплазмоз особенно опасен для беременных в 1 триместре и новорожденных, так как способен вызвать тяжелые поражения центральной нервной системы. Определение IgG-антител к *Toxoplasma gondii* у домашних животных используется с целью обнаружения носительства *T.gondii* и соответствующей опасности для хозяев животного.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизован антиген – *Toxoplasma gondii*. Антитела из образца связываются с антигеном на поверхности лунки. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью общевидового конъюгата мышинных моноклональных антител к IgG с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в исследуемом образце. Концентрация антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в исследуемых образцах рассчитывается по формуле, приведенной в инструкции.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Использование высокоочищенного препарата позволяет достичь высокой специфичности анализа.

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови кошачьих и собачьих с использованием Набора «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» не превышает 8,0%.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P101Z	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	CQ101CFZ	Калибровочная проба на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащая известное количество антител класса G (IgG) к Toxoplasma gondii, готова к использованию, 2.0 мл	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
3	CN101CFZ CP101CFZ	Контрольные сыоротки (отрицательный и положительный контроли) на основе сыоротки крови с известным содержанием антител класса G (IgG) к Toxoplasma gondii, готовы к использованию (2.0 мл и 2.0 мл соответственно)	2	шт.	прозрачная бесцветная жидкость и прозрачная жидкость красного цвета
4	T101CFZ	Конъюгат, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость красного цвета
5	S014Z2	ИФА-Буфер, готов к использованию (22 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6	R055Z	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	S008Z	Концентрат отмывочного раствора, 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	R050Z	Стоп-реагент, готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	N003	Бумага для клейвления планшета	2	шт.	-
10	K101CFI	Инструкция по применению Набора реагентов «Токсоплазма IgG-КС-ИФА»	1	шт.	-
11	K101CFQ	Паспорт контроля качества Набора реагентов «Токсоплазма IgG-КС-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18\dots+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2\dots+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «Токсоплазма IgG-КС-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 45 исследуемых образцов, 1 калибровочной пробы и 2 проб контрольных сывороток (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации антител класса G (IgG) к *Toxoplasma gondii* в контрольной сыворотке.

8.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 6 лунок для калибровочной пробы и контрольных сывороток.
2	Разбавьте образцы сыворотки (плазмы) крови кошачьих или собачьих в 21 раз, используя ИФА-Буфер (S014Z2). При добавлении исследуемого образца, не содержащего гепарин или ЭДТА, происходит изменение окраски буфера с синего на красный. Не разбавляйте калибровочные пробы и контрольную сыворотку.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 100 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 100 мкл разбавленных исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови кошачьих или собачьих. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
4	Аккуратно перемешайте содержимое планшета круговыми движениями по горизонтальной поверхности, закройте планшет бумагой для заклеивания планшета. Инкубируйте планшет в течение 30 минут при температуре +37 °С.
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунки аспирацией (например, с помощью водоструйного насоса) или декантированием и отмойте лунки 3 раза. При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок.
6	Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата.
7	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
8	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз.
9	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
10	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
11	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по воздуху.

12	<p>Рассчитайте содержание антител класса G (IgG) к Toxoplasma gondii в исследуемых образцах.</p> <p>1. Рассчитайте среднее ОП калибратора (ОПср);</p> <p>2. Определите граничное значение оптической плотности: для собак $ОПГ = ОПср * Q$ (значение Q указано в Паспорте серии) для кошек $ОПГ = ОПср * Q * 0,7$</p> <p>3. Для каждого образца вычислите коэффициент K, получаемый делением ОП образца на соответствующее значение ОПГ. При $K > 1.1$ образец положительный, при $K < 0.9$ – отрицательный. При значении K, лежащем в промежутке от 0.91 до 1.09 – результат в пограничной зоне (+/-).</p>
----	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Таблица М

Вид материала	Сбор, хранение и обработка материала	Пример разведения	Образец в лунку, мкл	Фактор пересчета
Сыворотка (плазма) крови кошачьих и собак	Исследуемые образцы должны быть тщательно отцентрифугированы. Анализ мутных, хилезных и гемолитических образцов может привести к искажению результатов.	25 мкл образца + 500 мкл ИФА-Буфера	100	1

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

10.2. Некоторые лаборатории на основании результатов собственных популяционных исследований вводят «второй cut-off», расположенный между анамнестическим («нормальным») и «высоким» уровнем IgG-антител, характерным для реактивации или позднего периода первичной инфекции.

Данные о величине «второго cut-off», полученные в лабораториях ХЕМА, приведены ниже как верхний предел для серопозитивных животных. Вместе с тем надо иметь в виду, что данный верхний предел может значительно отличаться в популяциях, имеющих значительно более высокий или более низкий уровень заболеваемости животных.

Если значение К лежит в интервале от 1.1 до «второго cut-off», это может свидетельствовать либо о начальном периоде первичной инфекции, либо об инфекции, перенесенной ранее. Чтобы прояснить ситуацию, необходимо исследовать повторные образцы крови того же обследуемого, взятые через несколько недель. Нарастание титра в повторном образце свидетельствует о наличии инфекции. Если же титр не нарастает, это свидетельствует об отсутствии активной инфекции и об анамнестическом характере антител.

Исследуемая группа	Единицы, К	
	Нижний предел	Верхний предел
Серонегативные	<0.1	0.9
Серопозитивные	1.1	4.9

По вопросам, касающимся качества Набора **«Токсоплазма IgG-КС-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE DETERMINATION OF IgG ANTIBODIES TO TOXOPLASMA GONDII IN CANINE AND FELINE SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* in canine and feline serum or plasma.

This kit is designed for determination of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii* in canine and feline serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 45 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Toxoplasmosis is a widespread infection caused by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Pets (cats and dogs) may serve as intermediate hosts for *T. gondii* and transmit infection to humans. In most cases, toxoplasmosis is a mild or asymptomatic disease; however, in immunocompromised patients this disease may be very severe and even life-threatening. Another risk group is pregnant women in whom primary toxoplasmosis can be transfected to the fetus, causing abortion or severe malformations. Testing of cats and dogs for toxoplasmosis is used to detect carrier state and thus to reveal the risk for humans.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by the antigen. Antibodies from the specimen bind coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards species specific Ig, labeled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that infectious agents are not present in the reagents of this kit. All samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	Toxoplasma IgG-CF EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL	polystyrene microwells coated with antigen Toxoplasma gondii	1	pcs	blue	2 months
3 CONTROL – CONTROL +	feine or canine IgG antibodies to Toxoplasma gondii diluted in tris buffered preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains blue dye dilution of preselected feline or canine serum, without IgG antibodies to Toxoplasma gondii with preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride, colourless; dilution of preselected canine serum with high content of canine IgG antibodies to Toxoplasma Gondii; with preservative – 0,01% Bronidox L, 0,01% 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one-hydrochloride; also contains red dye	2	pcs	colourless and red	2 months
4 CONJ HRP	aqueous solution of murine monoclonal antibodies to IgG coupled with horseradish peroxidase diluted on phosphate buffered solution with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and red dye	1	pcs	red	until exp.date
5 DIL SPE	phosphate buffered saline with casein from bovine milk and detergent (Tween-20), contains 0,1% phenol as preservative and blue dye	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	ready-to-use single-component tetramethylbenzidine (TMB) solution.	1	pcs	colourless	until exp.date
7 BUF WASH 21X	aqueous solution of sodium chloride and detergent (Tween 20), contains proClin300 as a preservative	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp.date Diluted washing solution – 1 month at +2...+8°C or 5 days at RT
8 STOP	5,0% vol/vol solution of sulphuric acid	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K101CFI	Instruction Toxoplasma IgG-CF EIA	1	pcs		N/A
11 K101CFQ	QC data sheet Toxoplasma IgG-CF EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl are useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, volume range 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0,1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma. Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 fold dilution in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 6 wells for the calibrator CAL and control samples CONTROL -, CONTROL + and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Dilute all samples using buffer DIL SPE (EIA buffer) 21 fold. (e.g. 25 µl of sample + 500 µl of diluent). After adding of samples (without heparin or EDTA), buffer changes colour from blue to red. Do not dilute control samples and calibrator.
3	Pipet 100 µl of calibrator, control samples CONTROL -, CONTROL + and diluted unknown samples into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 30 minutes at 37 °C .
5	Prepare washing solution by 21 fold dilution of washing solution concentrate BUF WASH 21X by distilled water. Minimal quantity of washing solution should be 250 µl per well. Wash strips 3 times
6	Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape.
7	Incubate 30 minutes at 37 °C .
8	Wash the strips 5 times.
9	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
10	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
11	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
12	Measure OD (optical density) at 450 nm.
13	Set photometer blank on air
14	Apply coefficient method for data reduction. 1. Calculate mean OD for Calibrator. 2. Calculate a cut-off value by the following formulas: - for dogs: cut-off = OD(Calibrator) * Q value (please, see the QC insert) - for cats: cut-off = OD(Calibrator) * Q value *0.7 3. Divide mean OD of each sample by the relevant cut-off. $K = \text{OD}(\text{sample}) / \text{Cut-off}$ 4. If the K value is greater than 1.1, the result is POSITIVE. If the K value is less than 0.9, the result is NEGATIVE. If the K value is between 0.9 and 1.1, the result is EQUIVOCAL.

7.5. Sample processing

Material type	Notes on material collection, storage and handling	Sample dilution example	Sample into the well, μl	Calculation factor
feline or canine serum or plasma	Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided and should be treated by centrifugation before testing.	25 μl of sample + 500 μl of diluent	100	1

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use external control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local 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.

9. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a veterinarian to elaborate therapeutic measures. Each laboratory should establish its own normal range for Toxoplasma IgG-CF. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

K-value more than 4.9 indicates high level response that may be associated with recent infection or vaccination.

Sex, age	Units, K	
	Lower limit	Upper limit
Seronegative	<0.1	0.9
Seropositive	1.1	4.9

