

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatizirana / ručna metoda

#TOP-WB24GM: 24 tests

#TOP-WB12GM: 12 tests

#TOP-WB96GM: 96 tests

UPUTE ZA UPOTREBU

Više informacija i Upute za upotrebu na vašem jeziku potražite na našoj web stranici

www.ldbiodiagnostics.com

NAMJENA

TOXOPLASMA Western Blot (WB) IgG-IgM je jednokratan imunoblotski test za usporedbu imunoloških profila (CIP-WB) za IgG i IgM koji je namijenjen dijagnostičiranju:

- Kongenitalna toksoplazmoza pri rođenju (D0): CIP-WB G + M između majke i pupčane krvi.
- Kongenitalna toksoplazmoza u post-natalnom praćenju (D + N): CIP-WB G + M između krvi iz pupkovine na D0 i djetetove krvi na D + N.
- Očna toksoplazmoza: CIP-WB IgG između pacijentovog seruma i vodenog humora.

Ovo ispitivanje nije namijenjeno ispitivanju ili potvrđivanju izoliranih serologija. Za tu aplikaciju koristite **LDBIO TOXO II IgG** test (ref. TOXO II IgG WB).

PRINCIP TESTA

Western Blot tehnika

Antigeni *Toxoplasma gondii*, jednom odvojeni elektroforezom, vezani su elektroblotom na površinu nitrocelulozne membrane (koja se naziva prijenos) izrezana na 24 trake označene brojevima od 1 do 24.

Izvedba testiranja

Napomena: Imunoblotski testovi IgG ili IgM opisani u nastavku provode se istovremeno tijekom manipulacije.

IgG imunoblot

Ispitivanje se sastoji od odvojenog inkubiranja, **s dvije susjedne trake iz istog prijenosa**, dva uzorka (serum ili vodeni humor) za koje se želi usporediti imunološki profili.

- Korak 1: Svaki uzorak seruma (ili vodenog humora) koji se ispituje odvojeno se inkubira trakom. Antitela protiv toksoplazme koja su potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vežu na antigene T. gondii.
- Korak 2: Konjugat alkalne fosfataze-**anti humani IgG** tada se veže na vezana antitijela.
- Korak 3: Imunokompleksi reagiraju sa supstratom. Antigeni prepoznati po **klasu IgG** anti-toxoplasma protutijela prisutni u uzorcima otkriveni su u obliku ljubičastih poprečnih traka.

IgM imunoblot

Način ispitivanja je identično, ali u koraku 2 prethodni konjugat zamijenjen je **anti humani IgM** konjugatom alkalne fosfataze i čovjeka. Stoga će razvoj boja otkriti antigene pojave prepoznate protutijela **klase IgM** protiv toksoplazme prisutne u uzorcima.

Čitanje

Uzastopna usporedba parova IgG i zatim IgM (ili IgA) traka omogućuje pokazujući potencijalnu prisutnost pojasa koje je razvio samo jedan od uzoraka, a ne drugi (usp. § Interpretacija).

REAGENSI UKLJUČENI

Zadana vrijednost: pakiranje od 24 testova (#TOP-WB24GM).

italic: pakiranje od 12 testova (#TOP-WB12GM) - **bold:** Pakiranje od 96 testova (#TOP-WB96GM).

ID	Kol.	Opis	Sastav
R1	1	Mape od 24 (12, 4x24) STRIPOVI: standardni + obojani standardi. (Svaka mapa i svaki prijenos identificira se jedinstvenim serijskim brojem)	Senzitizirana nitroceluloza. Molekularna težina u boji (kDa): Plava: 250, plava: 150, Plava: 100, Ružičasta: 75, Plava: 50, Zelena: 37, Ružičasta: 25, Plava: 20, Plava: 15.
R2	1	Bočica od 30 (30, 125) ml PUFERA ZA UZORAK (spremna za upotrebu - ružičasta otopina).	Pufer + surfaktant.
R3	1	Bočica (e) od 30 (30, 60) ml ANTI IgG KONJUGAT (spremna za upotrebu - plava otopina).	Pufer + anti-humani IgG poliklonalni kozji serum konjugiran s alkalnom fosfatazom + Na ₃ N (<0.1%) + stabilizatori.
R4	1	Bočica (e) od 30 (30, 60) ml ANTI-IgM KONJUGAT (spremna za upotrebu - žuta otopina).	Pufer + poliklonalni kozji anti-humani IgM serum konjugiran na alkalnu fosfatazu + Na ₃ N (<0,1%) + stabilizatore.
R5	1	Bočica od 30 (30, 125) ml SUBSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (60, 250) ml WASH CONCENTRATE 10X PUFER (Razrijediti 10 puta u destiliranoj vodi - bezbojna otopina).	Pufer + surfaktant.

R1: Slovo prije svakog broja trake specifično je za parametar.

R2, R3, R4, R5 i R6 zajednički su za sve kitove i imaju jedinstveni serijski broj koji ovisi samo o datumu njihove proizvodnje. **Preporučuje se provođenje višeparametarskog ispitivanja (vidi LDBIO raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.**

R3, R4, (Na₃N): EUH 032 - U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin.

EUH 210 Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev i na našoj web stranici www.ldbiodiagnostics.com.

POTREBNI DODATNI MATERIJAL KOJI NIJE UKLJUČEN

- Višekanalne polipropilenske inkubacijske posude za mini-mrlje (#WBPP-08 ili ekvivalent).
- Platforma za ljuhanje za imunoblokovne, vakuumski sustav za tekućine (kade # WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Cijevi i materijal za crtanje uzoraka, stupnjeviti cilindri, prilagođeni spremnici. Automatske pipete, mikropipete i vrhovi za jednokratnu uporabu (volumeni od 10 µl, 25µl, 1.2 ml i 2 ml).
- Destilirana ili deionizirana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna ljepljiva traka.
- Rukavice, pincete za rukovanje trakama, rezačem ili skalpelom, ravnim transparentnim ravnalom.

Napomena: Naši reagensi mogu se koristiti u automatiziranom imunoblot procesoru. **Treba paziti na moguću kemijsku kontaminaciju naših reagensa ako se procesor dijeli s reagensima drugog proizvođača** (poznati primjer: kontaminacija TWEEN-om 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervirajte bočice za procesor. Nakon obrade ne stavljajte preostale korištene reagense natrag u originalne bočice.

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Skladištiti između 2 i 8 ° C. Reagensi iz kita stabilni su do isteka roka valjanosti naznačenog na vanjskoj kutiji i naljepnicama bočice. Ne koristite kontaminirani ili mutni reagens. Pufer za ispiranje razrijeđen do 1/10

stabilan je 2 mjeseca na +2 do +8 ° C i jedan tjedan na sobnoj temperaturi.

MJERE OPREZA PRILIKOM UPOTREBE

Sigurnost

- Samo za *in vitro* uporabu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički osposobljeno osoblje. Rukovati u skladu s dobrom laboratorijskom praksom i smatrati svaki reagens i bilo koji uzorak potencijalno toksičnim i / ili zaraznim.
- Nosite laboratorijsku odjeću, rukavice i naočale; nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriju. Ne stavljajte pipete u usta.
- Supstrat sadrži mješavinu NBT-a i BCIP-a, toksičnog za kontakt (koža i sluznice) i inhalacija.
- Reagensi sadrže natrijev azid koji može tvoriti eksplozivne metalne soli s olovom i bakrom. Isprati prosuto vodom.
- Odložite otpad (uzorke, vrhove, epruvete, tekućinu za pranje, korišteni reagens ...) u skladu s dobrom praksom u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljni incident mora biti predmet prijave proizvođača i nadležnog tijela.

Mjere opreza

- Očitajte i protumačite rezultate pod izravnim bijelim svjetlom.
- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, osigurati sljedivost.
- Koristite trake u brojčanom redoslijedu. Nemojte miješati trake s različitim serijskim brojevima; koristiti prijenose uzastopce. Uspostavite poseban plan distribucije prije početka ispitivanja.
- Nemojte dodirivati trake prstima; koristite pincete.
- Reagensi se prije uporabe moraju dobro izmiješati, osobito koncentrirani pufer za ispiranje.
- Nakon upotrebe zatvorite bočice; nemojte koristiti ako je tvar slučajno uvedena u reagense. Ne koristite reagens iz bočice koja pokazuje znakove curenja. Nemojte koristiti mutnu ili istaloženu otopinu.
- Koristite samo vrhove pipeta za jednokratnu uporabu. Izbjegavajte kontaminaciju među kanalima. Pazite na stvaranje pjene ili mjehurića u vrhovima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica s reagensima).
- Inkubacijske posude čistite samo destiliranom vodom (nikada nemojte koristiti deterđent ili izbjeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili raspodjela neadekvatne količine može dovesti do negativan ili pozitivan testa, bez obzira na njegov stvarni status.

UZORKOVANJE

Aseptički skupite uzorke u suhe epruvete. Potrebno je najmanje 35 µl seruma ili 10µl vodenog humora. U slučaju vodenog humora, upotreba 25 µl povećati će osjetljivost testa (Pogledajte § Postupak).

Skladištite uzorke na 2-8 ° C dok se ne obrade. Ako moraju biti skladišteni duže od tjedan dana, potrebno je smrznuti uzorke na -20 ± 5 ° C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbjegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije primijećena posebna unakrsna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipemičnim serumima, preporuča se pažljivo tumačiti rezultate korištenja takvih uzoraka.

PRIPREMA REAGENSA

Pufer za ispiranje: Za 4 testa, u čistoj bočici, razrijedite 10 ml koncentrata za pranje 10X (**R6**) u 90 ml destilirane ili deionizirane vode. Pazite da dobro promiješate razrijeđeni pufer.

POSTUPAK

Napomena: Preporučuje se provođenje više parametarskog ispitivanja (vidi LDBIO raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.

1. Pažljivo pripremite plan distribucije uzorka.

Strogo je obavezna usporediti par uzoraka s spojenim trakama (neprekidni brojevi) iz određenog prijenosa (isti serijski broj). Nepouzdana je uspoređivati trake koje su međusobno udaljene (npr. Br. 2 i br. 15). **Opasno je** (lažni rezultati) uspoređivati trake iz različitih kompleta (trake s različitim serijskim brojevima).

2. Izrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suhog ravnog prozirnog ravnala, držite plavu crtu za pozicioniranje na trakama: držite trake čvrsto na mjestu s ravnalom i izrežite ih na strani naprezanja (brojevi su vidljivi kroz ravnalo).
3. Pipetirajte 1,2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu prema utvrđenom planu.
4. U brojčanom redosljedu položite numerirane trake u kanale: pustite da se trake ponovo hidriraju na površini pufera približno 2 minute s brojem vidljivim na vrhu, a ZATIM lagano protresite pladanj da biste ga u potpunosti uronili.
5. Raspršite uzorke prema utvrđenom planu distribucije (korak 1) i sljedećim količinama:

	Serum	Vodeni humor
IgG	10µl	10 ili 25µl
IgM	25µl	-

U slučaju vodenog humora, upotreba 25 ul povećat će osjetljivost testa.

Nježno protresite posudu nakon svakog doziranja. Stavite podložak na platformu za ljuljanje.

Inkubirajte 90 min ± 5 min na 20-26 ° C

6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala pomoću Pasteurove pipete ili okrećite ladicu za inkubaciju. U svaki kanal dodajte 2 do 3 ml razrijeđenog pufera za ispiranje. Inkubirajte na platformi za ljuljanje 3 minute. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Osigurajte da se trake ne okreću tijekom ovih koraka.
7. U skladu s utvrđenim planom distribucije, raspršite 1,2 ml anti-IgG konjugata (R3) ili 1,2 ml anti-IgM konjugata (R4) u svaku od odgovarajućih jažica. Stavite na platformu za ljuljanje i zaštitite je od izravnog svjetla. **Inkubirajte 60 min ± 5 min na 20-26 ° C**
8. Korak ispiranja: ponoviti korak 6
9. Pipetirajte 1.2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Stavite na platformu za ljuljanje i zaštitite je od izravnog svjetla. **Inkubirajte 60 min ± 5 min na 20-26 ° C**

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do točke gdje je čitanje teško (kvaliteta koraka ispiranja ima temeljni utjecaj na boju pozadine). Imajte na umu da će se trake osvjetljivati dok se suše.

- Važno je istodobno zaustaviti razvoj boje dvije trake određenog para za danu pod klasu antitijela, ali može se i nezavisno zaustaviti IgG ili IgM (IgMs u manjoj koncentraciji, obično se razvija sporije nego IgG).
- Dječji serum obično ima nižu koncentraciju IgM. Reakciji mora biti ostavljeno vrijeme da se pravilno razvije i ne treba se brinuti da majčinska IgM traka malo više potamni.
- Vodeni humor općenito ima nižu koncentraciju antitijela. Reakciji mora biti ostavljeno vrijeme da se pravilno razvije i ne treba brinuti da se trakice u serumu malo više potamne.

10. Zaustavite reakciju aspiriranjem supstrata s Pasteurovom pipetom ili okretanjem inkubacijske posude i ispuštanjem 2 ml destilirane vode u kanale. Ponovite ovaj zadnji korak pranja još jednom.
11. Sušenje trakica: Dok su kanali još uvijek napunjeni vodom, pomoću pinceta izvadite trake na numeriranom kraju i pohranite ih, s vidljivim brojem na Whatmanov upijajući papir. Neka se osuši na zraku. Boja traka prirodno će se olakšati tijekom sušenja. Tumačenje se mora obaviti samo nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Trake prenesite na list papira koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte linije pozicioniranja. Držeći ih na mjestu s ravnalom zalijepite vrh traka transparentnom ljepljivom trakom.

Usklađujte usporedno IgG i IgM trake svakog para uzoraka redoslijedom povećanja broja, slijedeći uspostavljeni plan distribucije (korak 1).

Strogo je obavezna usporediti par uzoraka s spojenim trakama (neprekidni brojevi) iz određenog prijenosa (isti serijski broj). Nepouzdana je uspoređivati trake koje su međusobno udaljene (npr. Br. 2 i br. 15). **Opasno je** (lažni rezultati) uspoređivati trake iz različitih kompleta (trake s različitim serijskim brojevima).

KONTROLA KVALITETE I INTERPRETACIJA

Opis traka

Pozitivan uzorak može predstavljati značajan broj opsega smještenih između 15 i 200 kDa. Za usporedbu profila mogu se upotrijebiti samo pojasevi s molekulskom masom manjom od 120 kDa.

Interpretacija

CIP WB G+M (kongenitalna toksoplazmoza)

- Kod rođenja (parovi majka/dijete):

Neovisno usporedite IgG trake i IgM trake. Čitajte dvije granične trake istovremeno od vrha do dna, primjećujući bilo koji antigeni **trak koji se nalazi u** krvi iz pupkovine **i koji nije** iz majčinog seruma.

Bilo koja traka koja ima dobro definiranu razlučivost, Molekularnu težinu (MW) manju od 120 kDa, a koja je prisutna samo u djetetu, dokaz je da je dijete sintetiziralo antitoksoplazmatska antitijela, što sugerira prirođenu toksoplazmozu.

- Tijekom praćenja nakon porođaja (dijete D0 / dijete D + N parovi):

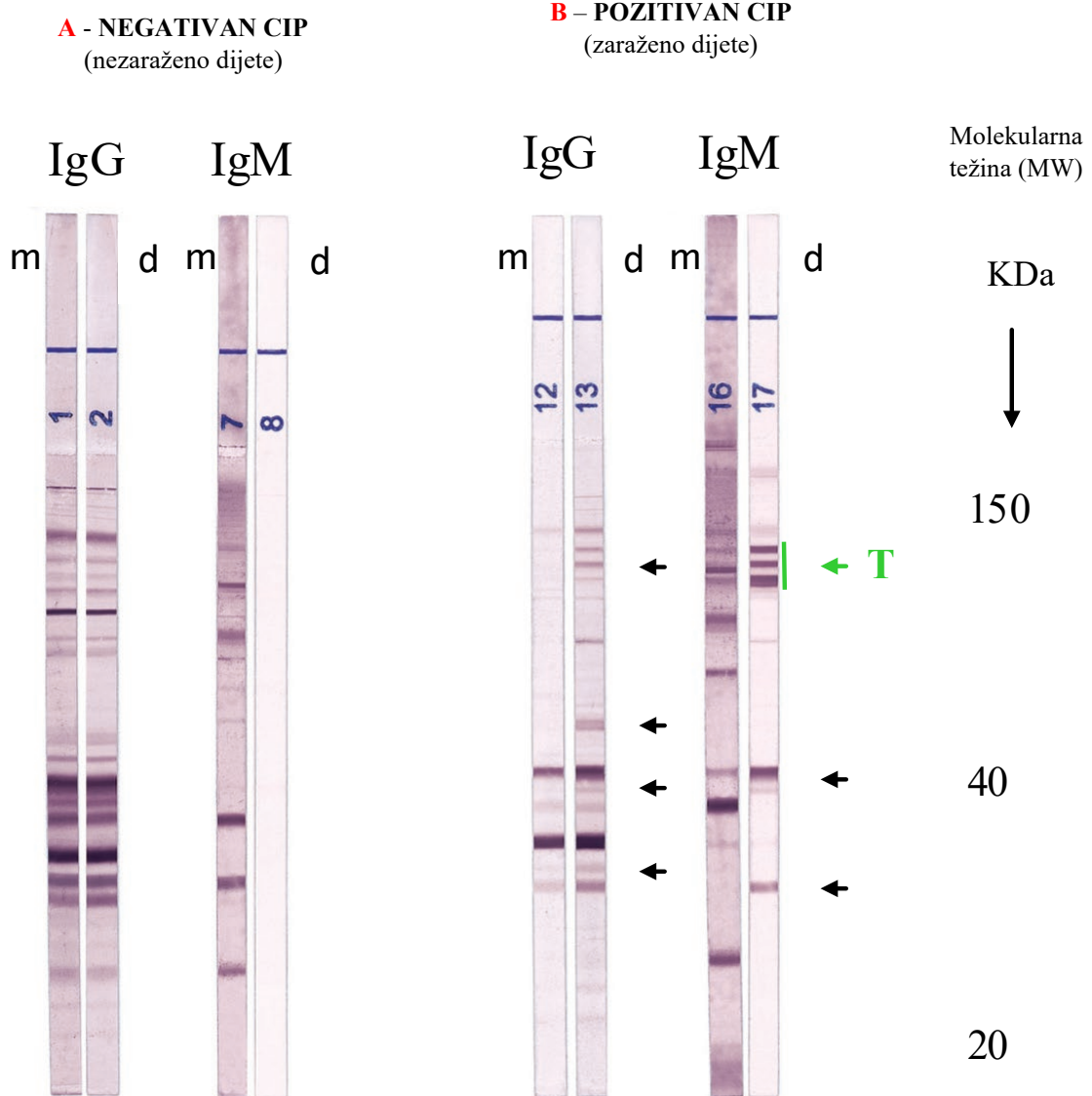
Neovisno usporedite IgG trake i IgM trake.

Pročitajte dvije istodobne trake od vrha do dna istovremeno, primjećujući bilo koji antigeni pojas koji je prisutan **u** serumu kod D + N **i koji nije** iz krvi iz pupkovine.

Bilo koja vrpca koja ima dobro definiranu razlučivost, MW <120 kDa i koja je prisutna samo kod D + N, dokaz je da je dijete sintetiziralo antitoksoplazmatska antitijela, što sugerira urođenu toksoplazmozu.

Napomena: indikacija CIP-WB IgG / IGM u postnatalnom praćenju namjerno je ograničena na 3 mjeseca za IgG i 1 mjesec za IgM.

Napomene: Usklađivanje obojenog standarda molekularne težine (mapa R1) omogućuje procjenu MW razvijenih antigenih traka (prethodno se mora izrezati ravnalom i skalpelom, poput obične trake i obraditi pincetom).



Slika. 1: Kongenitalna toksoplazmoza – Primjer pozitivnih i negativnih rezultata – (m= majke; d= djeteta)

Profili su dati kao primjeri. **Trake su označene slovom "A" specifičnim za parametar iz serije "00011".**

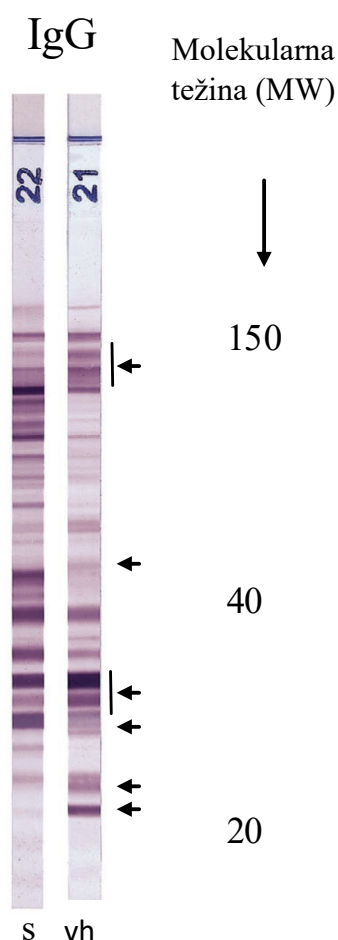
Par majke-djeteta (A) odgovara majci inficiranoj tijekom trudnoće, ali čije dijete nije inficirano: IgG profili su strogo identični (prenosi IgG); na djetetovim IgG i / ili IgM trakama nema drugog dodatnog pojasa: **CIP-WB JE NEGATIVAN.**

Par (B), urođena toksoplazmoza, odgovara majci zaraženoj tijekom trudnoće i čije je dijete također bilo zaraženo. Osim prenesenih antitijela, savršeno se primjećuje prisutnost dodatnih vrpca (←) za IgG i / ili IgM na djetetovim trakama, što odgovara antitijelima koje je sintetiziralo dijete: **CIP-WB je POZITIVAN.**

CIP WB IgG (očna toksoplazmoza)

Pročitajte dvije neprekidne trake od vrha do dna istovremeno, primjećujući bilo koji antigeni trak **koji** se nalazi u vodenom humoru (ah) i koji nije iz seruma (s).

Bilo koja traka koja ima dobro definiranu razlučivost, Molekularna težina (MW) manja od 120 kDa i koja je prisutna *samo u vodenom humoru*, pokazuje lokalnu sintezu antitoksoplazma protutijela, što sugerira okularnu toksoplazmozu.



Slika. 2: Očna toksoplazmoza – Primjeri pozitivnog rezultata – (S= serum; vh= Vodeni humor)

Profili su dati kao primjeri. **Trake su označene slovom "A" specifičnim za parametar iz serije "00011".**

Bitne stavke

1. Rezultati CIP-WB IgG / IgM moraju se tumačiti u svjetlu drugih kliničkih, seroloških, parazitoloških, epidemioloških i medicinskih slika, kako bi se postavila dijagnoza urođene ili očne toksoplazmoze.
2. Negativni rezultat IgG / IgM CIP-WB ne isključuje dijagnozu urođene ili očne toksoplazmoze. Te se bolesnike uvijek mora pratiti tijekom vremena dok se dijagnoza toksoplazmoze ne može definitivno potvrditi ili isključiti.
3. Aspekti traka mogu se uvelike razlikovati: uski, debeli, više ili manje obojeni, intenzivni itd. Kad se netko pozabavi ovom tehnikom, preporučuje se nekoliko usporedbi profila s poznatim parovima uzoraka kako bi se upoznali s njihovim čitanjem.
Na početku se također preporučuje da CIP-WB čitanje samostalno izvrše dvije osobe u laboratoriju. U slučaju neskladnih tumačenja, mora se provesti kontrolna CIP-WB.
4. Antigene frakcije vrlo velike molekulske mase (MW) su vrlo blizu zajedno u gornjem dijelu trake u korist boljeg rješavanja frakcija srednje i niske MW. Trake MW > 120 kDa stoga se ne mogu koristiti za tumačenje testa: uzorci koji predstavljaju samo takve razlike u profilima ne mogu se vratiti kao pozitivni.
5. Suprotno tome (kongenitalna toksoplazmoza), „pozitivan triplett“ (tri vrlo lako prepoznatljiva pojasa) smještena između 75 i 100 kDa vrlo često se nalazi na pozitivnim CIP-WB IgM (vidi „T“ Sl. 1, traka br. 17 do pravo).
6. Pri rođenju (kongenitalna toksoplazmoza) potrebno je obratiti posebnu pozornost na bilo kakvo opće pojačanje intenziteta traka (hemokoncentracija) koje bi moglo sugerirati postojanje dodatnih traka u

- krvi iz pupkovine. Serumi koji prikazuju takve razlike u profilu vraćaju se kao negativni.
7. Za razliku od toga (kongenitalna toksoplazmoza, očna toksoplazmoza), značajno pojačanje (često u širini i intenzitetu) jedne ili dvije izolirane trake, a dok su sve druge trake identičnog ili slabijeg intenziteta, smatra se kriterijem za pozitivnost.
 8. Prirodna antitijela (urođena toksoplazmoza):
Imunoblotska tehnika je izuzetno osjetljiva i antigen korišten za CIP-WB test odabran je za mnoštvo prisutnih antigenih traka.
Brojne publikacije spominju pojave koje je razvio imunoblot kod pojedinaca koji očito nikada nisu zarazili toksoplazmozom. Ova antitijela (IgG i IgM) se rijetko otkriju drugim tehnikama, ali ih imunoblot vrlo često detektira. Do njih može doći zbog unakrsnih reakcija s antitijelima usmjerenim protiv prirodnih imunogena koje tek treba utvrditi.
Zbog toga je indikacija za **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** test rezervirana za usporedbu profila. (za potvrdu serologije IgG koristite specifični test **LDBIO TOXO II IgG** koji je predviđen za tu uporabu).
Novorođenčad nemaju prirodna antitijela (osim majčinskih protutijela), ali vjerojatnost pojavljivanja prirodnih antitijela povećava se s dobi djeteta nakon 3 mjeseca; rijetko se nalaze između 3 i 6 mjeseci.
Zbog toga je indikacija za CIP-WB IgG / IgM u post-natalnom nadzoru namjerno ograničena na 3 mjeseca za IgG i 1 mjesec za IgM: nespecifične trake se pojavljuju ranije za IgM.
 9. "Heat Shock Protein" ("protein toplinskog udara" – kongenitalna toksoplazma):
Nespecifičan, uzak pojas slabog, ali promjenjivog intenziteta može biti prisutan za IgM do 37 kDa. To je predmet povezan s pripravom antigena i nazvan "Heat Shock Protein" Prisutna na obje trake para majke i djeteta, može se ipak dogoditi da bude izraženija određenim serumima tijekom praćenja djeteta. Ne uzimajte ovu traku u obzir.
 10. CIP-WB (očna toksoplazmoza): CIP-WB IgM se ne koristi u dijagnozi očne toksoplazmoze. Međutim, CIP-IgA predstavlja dijagnostički interes. Za više informacija o CIP-IgA, molimo kontaktirajte nas.

OGRANIČENJE KORIŠTENJA

- Dijagnoza zarazne bolesti ne može se uspostaviti na temelju jednog rezultata testa.
- Da bi se uspostavila dijagnoza, serološki se rezultati moraju tumačiti na temelju dostupnih podataka (npr. Epidemiologija, klinika, snimanje, biologija ...). Ne smiju se koristiti za postavljanje dijagnoze samo na temelju njihove pozitivnosti.

IZVEDBA (vidi reference iz literature S. 11)

Studije su provedene od strane nezavisnih referentnih laboratorija

CIP-WB G+M: KONGENITALNA TOKSOPLAZMOZA kod rođenja (majka/dijete)

		TOKSOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
KLINIČKI PODACI	POS CT n = 54	41	13
	NEG CT n = 60	0	60

Tablica 1: Izvedba CIP-WB IgG/IgM kod rođenja (n = 114):

Specifičnost = 100%

Pozitivna prediktivna vrijednost = 100%

Osjetljivost = 76%

Negativna prediktivna vrijednost = 83%

CIP-WB G+M: KONGENITALNA TOKSOPLAZMOZA kod postporođajnog praćenja (dijete D0/D20)

Od 54 djece prethodno testirane na D0 (**Tablica 1**), 10 neinficirane djece i 12 zaražene djece (n = 22) nadzirano je do D20 i retrospektivno je analizirano testom **TOKSOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **U D0:** 4 od 12 zaražene djece nije pokazalo profil drugačiji od rođenja (lažni negativni).
- **U D20:** 1 dijete ostaje negativno.

		TOKSOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
KLINIČKI PODACI	POS CT n = 12	11	1
	NEG CT n = 10	0	10

Tablica 2: Izvedba CIP-WB IgG/IgM na D20 (n = 22)

Specifičnost = 100%

Pozitivna prediktivna vrijednost = 100%

Osjetljivost = 92%

Negativna prediktivna vrijednost = 91%

CIP-WB IgG: OČNA TOKSOPLAZMOZA (serum/vodeni humor)

Dolje prikazane izvedbe su iz meta-analize četiri studije koje su objavili referentni centri.

Ove studije uspoređuju performanse CIP-WB **IgG** s onima Goldmannove Witmer koeficijenta (GWC) i PCR. Oni također pokazuju dijagnostičke performanse dobivene kombiniranim spajanjem dviju ili triju ovih tehnika.

Sve su ove četiri studije koristile LDBIO test u skladu s preporukama u uputama za uporabu kompleta.

Osjetljivost je određena na 113 pacijenata koji su imali klinički dokazanu očnu toksoplazmozu. Specifičnost je izračunata na kontrolnoj populaciji koja je pokazala očno stanje koje nije toksoplazmatska infekcija: očna toksokariaza (n = 5), virusna infekcija (n = 10), druge infekcije (n = 4), neinfektivna očna stanja (n = 126) od kojih katarakta (n = 42).

Osjetljivost (Se)

Ukupna osjetljivost CIP-WB IgG iznosi **62,8%** (n = 113), performanse koje su uporedive s GWC (Se = 61,0%, n = 113) i veće od PCR (Se = 43,5%, n = 92, p = 0,0028).

Kombinacija CIP-WB-a sa GWC-om i PCR-om poboljšava osjetljivost dijagnoze:

CIP-WB + GWC: Se = 78,1% (n=96, p=0,0082)

CIP-WB + GWC + PCR: 86.3% (n=95, p=0.0001)

Specifičnost (Sp)

Ukupna specifičnost CIP-WB IgG je **92,8%** (n = 111), performanse koje su usporedive sa GWC (Sp = 94,2%, n = 139) i manje od PCR (Sp = 100%, n = 131, p = 0,0009).

Kombinacija dviju tehnika, CIP-WB IgG + GWC, malo smanjuje specifičnost dijagnoze (Sp = 91,1%, n = 101, p = 0,32). Kombinacija s PCR-om ne utječe na specifičnost.

Zaključak

Imunološki test **Toxoplasma WB IgG IgM** ima izvrsne performanse u dijagnozi kongenitalne ili okularne toksoplazmoze.

U kongenitalnoj toksoplazmozi, CIP-WB G + M ima osjetljivost od **76%** [95CI 62-86%] i specifičnost od **100%** [95CI 92-100%] pri rođenju. Ponovno testiranje u prvom mjesecu života dodatno povećava osjetljivost CIP-WB G + M.

U okularnoj toksoplazmozi, CIP-WB IgG ima osjetljivost od **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] i specifičnost od **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Kombinacija s drugim tehnikama (GWC i / ili PCR) povećava dijagnostičke performanse.

Reproducibilnost

Ispitana je inter-serijska i inter-lot reproduktivnost. U oba slučaja, korelacija seruma i seruma s obzirom na specifične vrpce je odlična.

Interferencije

Iako nije zabilježena posebna križna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporuča se pažljivo interpretirati rezultate korištenja takvih uzoraka.

RJEŠAVANJE PROBLEMA

"Trake su blijede s malo kontrasta": Određeni serumi s niskim koncentracijama antitijela mogu dati takve rezultate.

"Vide se zasjenjena područja, više ili manje obojena, malo difuzna": Traka nije potpuno potopljena u jedan od reagensa i nije se pravilno inkubirala duž cijele dužine. Mrlje mogu također biti prisutne tamo gdje je uzorak bio odložen, ako se pladanj nije protresao nakon točenja.

"Pozadinska buka je značajna, što otežava čitanje": Ispiranje je bilo nedovoljno ili je posljednja inkubacija bila predugačka. Osigurati dobre tehnike ispitivanja, poštivati vrijeme ispiranja i osigurati kvalitetu vode. Smanjiti vrijeme posljednje inkubacije.

Iznimno, određeni serumi mogu reagirati na nespecifičan način. Tada se rezultat imunoblota ne može koristiti. Ova nespecifična pozadinska buka može uključivati samo dio trake, što rezultate čini nerazumljivim samo za taj dio.

"U posljednjem stupnju razvoja pojavljuje se talog u otopini": supstrat može u stvari djelomično precipitirati (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne mijenja kvalitetu razvoja koji se mora normalno nastaviti. Posljednje ispiranje destiliranom vodom eliminira moguće krute čestice.

Literatura

- Fekkar, A. *et al.* Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1965–1967 (2008).
- Garweg, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* **27**, 61–68 (2005).
- Garweg, J. G., de Groot-Mijnes, J. D. F. & Montoya, J. G. Diagnostic Approach to Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation* **19**, 255–261 (2011).
- Garweg, J. G., Garweg, S.-D. L., Flueckiger, F., Jacquier, P. & Boehnke, M. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4593–4598 (2004).
- Goldmann, H. & Witmer, R. [Antibodies in the aqueous humor]. *Ophthalmologica* **127**, 323–330 (1954).
- L'ollivier, C. *et al.* Comparison of Mother and Child Antibodies That Target High-Molecular-Mass *Toxoplasma gondii* Antigens by Immunoblotting Improves Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1326–1328 (2012).
- Maenz, M. *et al.* Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* **39**, 77–106 (2014).
- Magi, B. & Migliorini, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol.* **34**, 93–95 (2011).

- Pinon, J. M. *et al.* Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2267–2271 (2001).
- Potasman, I., Araujo, F. G. & Remington, J. S. Toxoplasma antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 1050–1054 (1986).
- Remington, J. S., Thulliez, P. & Montoya, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 941–945 (2004).
- Rilling, V., Dietz, K., Krczal, D., Knotek, F. & Enders, G. Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 174–180 (2003).
- Robert-Gangneux, F. *et al.* Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 34–38 (2004).
- Robert-Gangneux, F. & Darde, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 264–296 (2012).
- Runday, M. J., Ongkosuwito, J. V., Rothova, A. & Kijlstra, A. Intraocular anti-Toxoplasma gondii IgA antibody production in patients with ocular toxoplasmosis. *Am. J. Ophthalmol.* **127**, 294–300 (1999).
- Talabani, H. *et al.* Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 2131–2135 (2009).
- Tridapalli, E. *et al.* Congenital toxoplasmosis: the importance of the western blot method to avoid unnecessary therapy in potentially infected newborns. *Acta Paediatr.* **97**, 1298–1300 (2008).
- Turunen, H. J., Leinikki, P. O. & Saari, K. M. Demonstration of intraocular synthesis of immunoglobulin G toxoplasma antibodies for specific diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 988–992 (1983).
- Villard, O. *et al.* Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Immunoblotting, and PCR for Diagnosis of Toxoplasmic Chorioretinitis. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3537–3541 (2003).
- Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of Toxoplasma gondii infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2015).

OBVIJEST O AŽURIRANJU - Pažljivo pročitajte

DATUM IZLASKA	VERZIJA	SAŽETAK MODIFIKACIJE
26/07/2021	Vs 18	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - Kontakt adresa e-pošte – NaN3 EUH 032.
29/07/2022	Vs 19	R6 NaN3 nélkül. A betűvel jelölt szalag. Különböző tételekből származó reagensek lehetséges használata.
30/11/2022	Vs20	Nova adresa



24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com