

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

Imunoblot pro použití jako *in vitro* diagnostikum

Ruční / poloautomatická technologie

#TOP-WB24GM: 24 testů

#TOP-WB12GM: 12 testů

#TOP-WB96GM: 96 testů

INSTRUKCE NA POUŽITÍ

Další informace a pokyny k použití ve vašem jazyce naleznete na našich webových stránkách

www.ldbiodiagnostics.com

ÚČEL POUŽITÍ

TOXOPLASMA WB IgG-IgM je kvalitativní test na jedno použití imunoblot pro srovnání imunologických profilů (CIP-WB) pro IgG a IgM, které je určeno pro diagnostiku:

- vrozené toxoplazmózy při narození (D0): CIP-WB G+M mezi maternální a pupečnickovou krví.
- vrozené toxoplazmózy při postnatálním monitoringu (D+N): CIP-WB G+M mezi pupečnickovou krví a dětskou krví na D+N.
- okulární toxoplazmózy: CIP-WB IgG mezi patientským sérem a slznou tekutinou.

Toto stanovení není určeno pro screening nebo konfirmaci v izolovaném séru. Pro tento účel použijte **LDBIO TOXO II IgG** test (ref. TOXO II IgG WB).

PRINCIP TESTU

Western Blot technika

Antigeny *Toxoplasma gondii* se po separaci elektroforézou vážou elektroblotováním na povrch nitrocelulózové membrány (tzv. transfer). Ta se rozstříhá na 24 stripů označených od 1 do 24.

Provedení testu

Pozn.: Stanovení IgG nebo IgM imunoblot, popsaná níže, se provádějí souběžně.

IgG Immunoblot

Toto stanovení sestává z oddělené inkubce **2 sousedících stripů ze stejného transferu**, se dvěma vzorky (séra nebo slzné tekutiny), pro které se provádí srovnání imunologických profilů.

- Krok 1: Každý vzorek séra (nebo slzné tekutiny) se testuje odděleně inkubací se stripem. Protilátky proti *Toxoplasmě*, potenciálně přítomné ve vzorku, se selektivně vážou na antigeny *T. gondii*.
- Krok 2: Konjugát alkalické fosfatázy a **protilidského IgG** se pak váže na navázané protilátky.
- Krok 3: Imunokomplexy reagují se substrátem. Antigeny rozlišují **třídu IgG** protilátek proti *Toxoplasmě* přítomnou ve vzorku a projeví se jako purpurový příčný proužek.

IgM imunoblot

Princip stanovení je identický, ale v kroku 2 výše se konjugát nahradí konjugátem alkalické fosfatázy s **protilidským IgM**. Pokud se vyvine proužek, rozlišuje tedy **třídu IgM** protilátek proti *Toxoplasmě* ve vzorku.

Odečet

Úspěšné přiřazení párů IgG a pak IgM (nebo IgA) stripů umožňuje prokázat potenciální přítomnost proužků, které se vyvinou pouze u jednoho vzorku a ne u jiného (viz § Interpretace).

REAGENCIE DODANÉ

Výchozí: balíček 24 testů (#TOP-WB24GM)

kurzívou: balení 12 testů (#TOP-WB12GM) - **tučně**: balení **96 testů** (#TOP-WB96GM).

ID	Ks	Popis	Složení
R1	1	Obal(y) obsahující 24 (12, 4x24) STRIPŮ: nastříhané + zbarvené Standardy. (Každá záložka a každý transfer je identifikovaný unikátním sériovým číslem.)	Potažená nitrocelulóza. Zbarvení molekulových hmotností (kDa): Modrá: 250, Modrá: 150, Modrá: 100, Růžová: 75, Modrá: 50, Zelená: 37, Růžová: 25, Modrá: 20, Modrá: 15.
R2	1	Lahvička s 30 (30, 125) mL pufru na ředění vzorku SAMPLE BUFFER (k přímému použití - růžový roztok).	Pufr + surfaktant.
R3	1	Lahvička (y) s 30 (30, 60) mL konjugátu ANTI IgG CONJUGATE (k přímému použití – modrý roztok).	Pufr + protilidské IgG polyklonální kozí sérum konjugované s alkalickou fosfatázou + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizátory.
R4	1	Lahvička(y) s 30 (30, 60) mL konjugátu ANTI-IgM CONJUGATE (k přímému použití – žlutý roztok).	Pufr + polyklonální kozí protilidské IgM sérum konjugované s alkalickou fosfatázou + NaN ₃ (< 0.1%) + stabilizátory.
R5	1	Lahvička s 30 (30, 125) mL substrátu - SUBSTRATE (k přímému použití – tmavá hnědá lahvička).	Pufr + NBT + BCIP + stabilizátory.
R6	1	Lahvička obsahující 60 (60, 250) mL koncentrovaného promývacího roztoku - WASH CONCENTRATE 10X BUFFER (<u>Musí se 10x zředit</u> s destilovanou vodou – bezbarvý roztok).	Pufr + surfaktant.

R1: Písmeno před každým číslem proužku je specifické pro daný parametr.

R2, R3, R4, R5 a R6 jsou obecné pro všechny kity a mají unikátní číslo šarže podle svého data výroby. Je doporučeno provádět multiparametrové testování (viz škála imunoblotů LDBIO), aby se omezil počet otevření lahviček a usnadnilo se řízení kvality.

R3, R4 (NaN₃): EUH 032 - Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

Bezpečnostní list EUH 210 je k dispozici na vyžádání a také na našich webových stránkách www.ldbiodiagnostics.com.

DALŠÍ NUTNÝ ALE NEDODANÝ MATERIÁL

- Multikanálové polypropylénové inkubační vaničky pro miniblotty (# WBPP- 08 nebo obdobné).
- Třepačka pro imunoblotty, vakuový systém pro tekutiny (vaničky # WBPP- 08, které dodáváme lze vyprázdnit jejich jednoduchým otočením).
- Zkumavky a materiál na odběr vzorků, odměrné válce, kontejnery. Automatické pipety, mikropipety a jednorázové špičky (objemy 10 μ L, 25 μ L, 1.2 mL a 2 mL).
- Destilovaná nebo deionizovaná voda. Absorbční papír (např. filtrační papír Whatman), průhledná lepicí páska.
- Rukavice, pinzety na uchopení stripů, řezátko nebo skalpel, rovné průhledné pravítko.

Pozn.: Naše reagentie lze použít s automatizovaným procesorem imunoblotů. **Dbejte, aby nedošlo k chemické kontaminaci našich reagentií, pokud ho používáte i s reagentii jiných výrobců** (známý příklad: kontaminace TWEEN 20), a k bakteriální kontaminaci. Vyhradte si lahvičky pro procesor. Po zpracování nevracejte zbytek reagentií zpět do originálních lahviček.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte mezi 2 a 8°C. Reagentie z kitu jsou stabilní do data expirace uvedeného na vnějším obalu a na štítcích lahviček. Nepoužívejte kontaminované nebo zakalené činidlo. Promývací pufr naředěný 1/10 je stabilní po 2 měsíce při +2 až +8 °C a jeden týden za pokojové teploty.

UPOZORNĚNÍ PRO POUŽITÍ

Bezpečnost

- Pouze pro *in vitro* použití. Pouze pro profesionální použití. Pouze pro technicky vyškolený personál. Pracujte podle zásad správné laboratorní praxe a považujte každou reagentii a vzorek za potenciálně toxický a/nebo infekční.
- Používejte laboratorní plášť, rukavice a brýle; nepijte, nejezte nebo nekuřte v laboratoři. Nepipetujte ústy.
- Substrát obsahuje směs NBT a BCIP, které jsou toxické při kontaktu (pokožka a sliznice) a při inhalaci.
- Reagentie obsahují azid sodný, který může tvořit explozivní soli kovů s olovem a mědí. Při vylití oplachujte vodou.
- Odpad likvidujte (vzorky, špičky, zkumavky, promývací tekutinu, použité reagentie...) podle zásad správné laboratorní praxe, platných v současnosti ve vaší zemi.
- Jakýkoli závažný incident musí být předmětem prohlášení pro výrobce a příslušný orgán.

Upozornění

- Odečtěte a interpretujte výsledky pod přímým bílým světlem.
- Je vhodnější použít všechna činidla ze stejné šarže. Pokud se používají různé šarže, zajistěte sledovatelnost..
- Stripy používejte podle stoupajících čísel. Nemíchejte stripy různých sériových čísel, řiďte se podle posloupností transferů. Zaveďte si specifický distribuční plán před započtením testu.
- Nedotýkejte se stripů prsty; použijte pinzety.
- Reagentie musí být před použitím dobře promíchány, zejména koncentrovaný promývací pufr.
- Po použití uzavřete lahvičky; nepoužívejte je, pokud se reagentie znečistí. Nepoužívejte reagentie z lahvičky, která teče. Nepoužívejte zakalené nebo vysrážené roztoky.
- Používejte pouze jednorázové pipetovací špičky. Vyvarujte se kontaminace mezi žlábký. Sledujte tvorbu pěny nebo bublin v pipetovací špičce (bakteriální kontaminace lahvičky s reagentií).
- Inkubační vaničku očistěte pouze čistou vodou a pak destilovanou vodou (nikdy nepoužívejte detergent nebo chlornan).
- Pokud zapomenete vzorek napipetovat nebo dáte nesprávný objem, může vyjít negativní nebo pozitivní, bez ohledu na jeho skutečný stav.

ODBĚR VZORKU

Asepticky odebírejte vzorky do suché zkumavky. Je požadováno minimálně 35 μL séra nebo 10 μL slzné tekutiny. V případě slzné tekutiny zvýší citlivost testu použití 25 μL . (Viz § Postup Testu.)

Uchovejte vzorky při 2-8 °C až do jejich testování. Při skladování delším než jeden týden, zmrazte vzorek na -20 ± 5 °C. Zabraňte opakovanému zmrazení a rozmrazení.

Přestože nebyla pozorována zkřížená reakce u hemolyzovaných, ikterických nebo lipidických sér, je doporučeno interpretovat výsledky z každého použití takových vzorků s opatrností.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací pufr (Wash buffer): Na 4 testy naředte do čisté nádoby 10 mL Wash Concentrate 10X (R6) do 90 mL destilované nebo deionizované vody. Zředěný pufr pečlivě promíchejte.

POSTUP TESTU

Poznámka: Je doporučeno provést multiparametrové testování (viz škála imunoblotů LDBIO), aby se omezil počet otevření lahvičky a zabezpečila se kontrola kvality.

1. Připravte si distribuční plán pro vzorky

Je striktně doporučeno srovnávat páry vzorků se souvisejícími stripy (sousedící čísla) z daného transferu (stejně sériové číslo). Je nevhodné srovnávat stripy, které jsou příliš daleko od sebe (např. č.2 a č.15). **Je chybné** (falešný výsledek) srovnávat stripy z různých kitů (stripy s různými sériovými čísly).

2. Odřízněte požadovaný počet stripů (R1) pomocí skalpelu a čistého a suchého průhledného pravítka, aby zůstala modrá linie na stripech: držte stripy pevně pravítkem a po straně je odřízněte (čísla jsou viditelná přes pravítko).
3. Dejte 1.2 mL pufru na vzorek (R2) do každého žlábku podle vypracovaného plánu.
4. Umístěte očíslované proužky do jamek v číselném pořadí: nechte proužky přibližně 2 minuty rehydratovat na povrchu pufru s číslem viditelným směrem nahoru, POTÉ nádobou jemně zatřeste, aby se zcela ponořily do pufru.
5. Dejte vzorky podle distribučního plánu (krok 1) a v následujících objemech:

	Sérum	Slzná tekutina
IgG	10 μL	10 nebo 25 μL
IgM	25 μL	-

V případě slzné tekutiny zvýší použití 25 μL citlivost testu.

Opatrně zamíchejte vaničkou po každé dispenciaci. Položte vaničku na třepačku.

Inkubujte 90 min \pm 5 min při 20-26 °C.

6. Promývací krok: Vyprázdněte obsah žlábků Pasteurovou pipetou nebo překlopením inkubační vaničky. Dejte 2 až 3 mL naředěného promývacího pufru do každého žlábku. Inkubujte na třepačce 3 min. Opakujte 2 krát, pak vyprázdněte obsah žlábků. Dbejte, aby se stripy během tohoto kroku neobrátily.
7. Dejte podle zavedeného distribučního plánu 1.2 mL konjugátu anti-IgG (R3) nebo 1.2 mL konjugátu anti-IgM (R4) do každé odpovídající jamky. Vaničku umístěte na třepačku. **Inkubujte 60 min \pm 5 min při 20-26 °C.**
8. Promývací krok: opakujte krok 6.
9. Dejte 1.2 mL NBT/BCIP substrátu (R5) do každého žlábku. Umístěte na třepačku a chraňte před

přímým světlem. **Inkubujte 60 min ± 5 min** při 20-26 °C.

Bez ohledu, o jaký parametr jde, pravidelně kontrolujte vývoj zbarvení. Vývoj může být zastaven, pokud by barva pozadí ztěžovala odečet stripů (kvalita promývacích kroků má zásadní vliv na vybarvení pozadí). Pamatujte, že stripy po vyschnutí zesvětlí.

- Je zásadní, aby se reakce současně se vyvíjejících 2 stripů v páru pro danou třídu protilátek zastavila současně, ale je možné nezávisle na sobě zastavovat IgG a IgM (IgM v nižší koncentraci se obvykle vyvíjí pomaleji než IgG).
- Dětské sérum má obecně nižší koncentraci IgM. Reakce se musí dostatečně správně vyvinout a nebuďte překvapeni, že bude maternální IgM strip poněkud tmavší.
- Slzná tekutina má obecně nižší koncentraci protilátek. Reakce se tedy musí správně načasovat pro vyvinutí a lze počítat s tím, že budou stripy séra poněkud tmavší.

10. Zastavte reakci odsátím substrátu Pasteurovou pipetou nebo převrácením žlábků a napipetováním 2 mL destilované vody do žlábků. Opakujte tento poslední promývací krok ještě jednou.

11. Vysušení stripů: Když je ještě ve žlábkách voda, berte stripy pomocí pinzet na očíslované straně a pokládejte je na absorbční papír Whatman tak, aby bylo vidět čísla. Nechte je oschnout. Barva se po vysušení zesvětlí. Interpretace se musí provést až po úplném vysušení.

12. Uložení: Proužky přeneste na list papíru, který bude sloužit k jejich uložení. Zarovnejte modré polohovací čáry. Proužky přidržte pravítkem a přilepte je shora průhlednou páskou.

Srovnajte vedle sebe stripy IgG a IgM podle párových vzorků a stoupajících čísel, jak jste si zavedli v distribučním plánu (krok 1).

Je striktně doporučeno srovnávat páry vzorků se souvisejícími stripy (sousedící čísla) z daného transferu (stejně sériové číslo). Je nevhodné srovnávat stripy, které jsou příliš daleko od sebe (např. č.2 a č.15). **Je chybné** (falešný výsledek) srovnávat stripy z různých kitů (stripy s různými sériovými čísly).

KONTROLA KVALITY A INTERPRETACE

Popis proužků

Pozitivní vzorek může mít velký počet proužků lokovaných mezi 15 a 200 kDa. Pouze proužky s molekulovou hmotností menší než 120 kDa lze použít na srovnání profilů.

Interpretace

CIP WB G+M (vrozená toxoplazmóza)

- Při porodu (páry matka/dítě):

Nezávisle na sobě srovnajte stripy IgG a IgM.

Vzájemně příslušející 2 stripy odečítejte současně odshora dolů, zda jsou **přítomny** proužky v pupečnickové krvi **a současně chybí** v mateřském séru.

Jakýkoliv dobře definovaný proužek, s molekulovou hmotností (MW) menší než 120 kDa, a který je *přítomen pouze u dítěte*, je známkou, že dítě tvoří protilátky proti toxoplazmě, což znamená vrozenou toxoplazmózu.

- Při postnatálním monitoringu (dítě D0/dítě D+N páry):

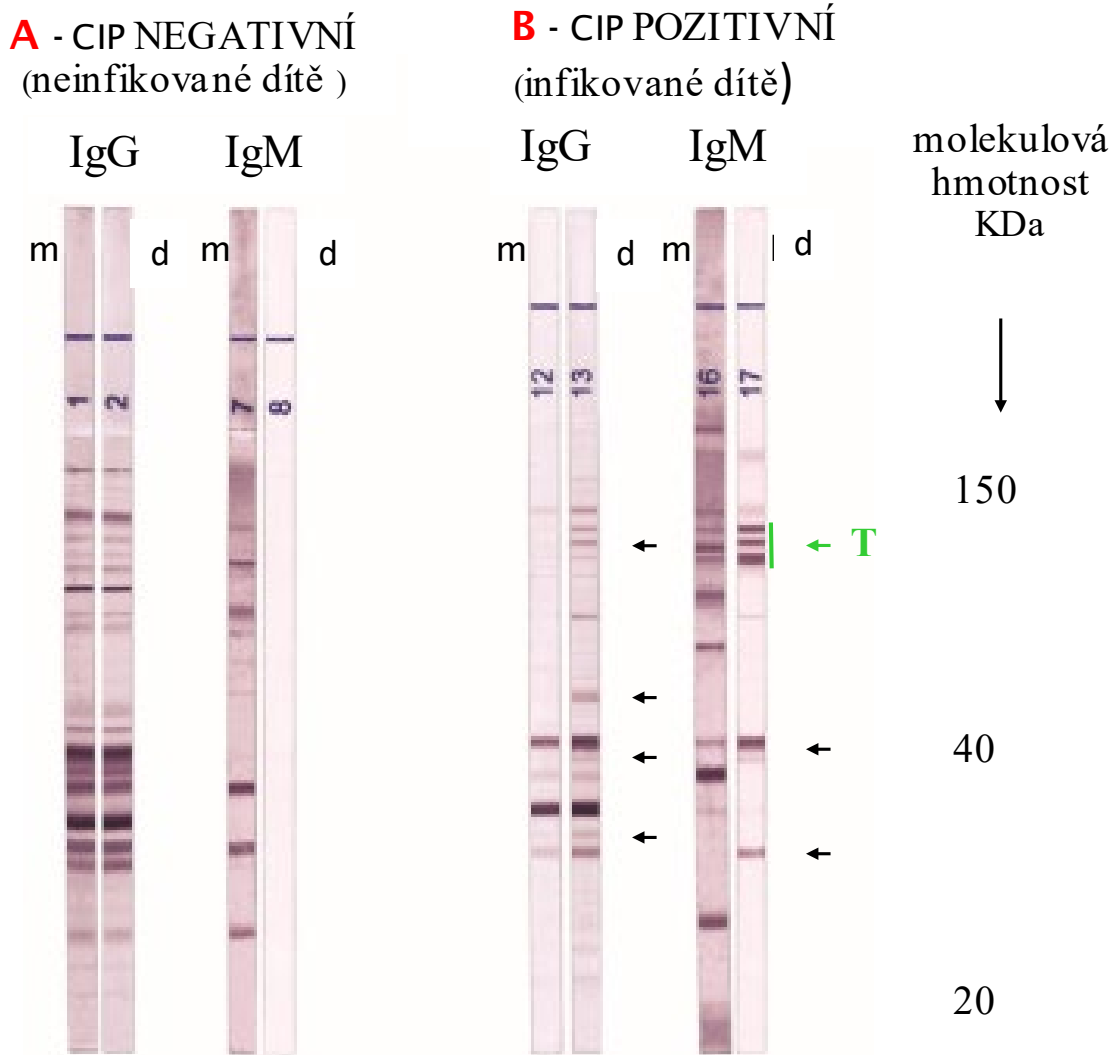
Nezávisle srovnajte stripy IgG a stripy IgM.

Vzájemně příslušející 2 stripy odečítejte současně odshora dolů, zda není přítomen antigenický proužek, který je **přítomen** v séru u D+N **a chybí** v pupečnickové krvi.

Jakýkoliv proužek, dobře viditelný na MW < 120 kDa, *přítomný pouze na D+N*, je známkou, že dítě tvoří protilátky proti toxoplazmě, což znamená vrozenou toxoplazmózu.

Pozn.: Indikace CIP-WB IgG/IGM u postnatálního monitoringu je záměrně omezena na 3 měsíce pro IgG a 1 měsíc pro IgM.

Poznámka: Porovnání vybarvených standardů molekulových hmotností (složka R1) umožňuje odhadovat molekulovou hmotnost MW vyvinutých antigenních proužků (musí se předem vyříznout pomocí pravítka a skalpelu, pracujte s ním pinzetami).



Obr. 1: Vrozená toxoplazmóza – příklady pozitivních a negativních výsledků – (m=matka; d= dítě)

Profily jsou uvedeny jako příklady. Proužky jsou označeny písmenem "A" specifickým pro parametr ze šarže "00011".

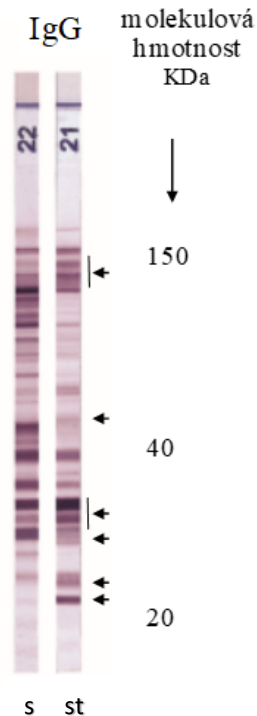
Pár matka –dítě (A) odpovídá infekci matky během těhotenství, ale její dítě není infikováno: Profily IgG jsou přesně identické (přenos IgG); není zde přítomen žádný jiný proužek na dětských stripech IgG a/nebo IgM: **CIP-WB JE NEGATIVNÍ.**

Pár (B), vrozená toxoplazmóza, odpovídá infekci matky během těhotenství a její dítě je také infikováno. Kromě přenesených protilátek je také perfektně vidět přítomnost dalších proužků (←), pro IgG a/nebo IgM na dětském stripu, což odpovídá protilátkám nově vytvořeným u dítěte: **CIP-WB JE POZITIVNÍ.**

Interpretace CIP WB IgG (okulární toxoplazmóza)

Odečtete 2 související stripy současně odshora dolů na proužky antigenů **přítomných** v slzné tekutině **a chybějících** v séru.

Jakýkoliv dobře definovaný proužek s molekulovou hmotností (MW) menší než 120 kDa a *přítomný pouze v slzné tekutině*, je známkou lokální tvorby protilátek proti toxoplazmě, což znamená okulární toxoplazmózu.



Obr. 2: Okulární toxoplazmóza – příklad pozitivního výsledku – (s= serum; st= slzné tekutiny)

Profily jsou uvedeny jako příklady. **Proužky jsou označeny písmenem "A" specifickým pro parametr ze šarže "00011".**

Velmi důležité poznámky

1. Výsledky CIP-WB IgG/IgM se musí interpretovat v souvislosti s dalšími klinickými, sérologickými, parazitologickými, epidemiologickými a zdravotními informacemi, než se vystaví diagnóza vzorene nebo okulární toxoplazmózy.
2. Negativní výsledek CIP-WB IgG/IgM nevylučuje diagnózu vrozené nebo okulární toxoplazmózy. Tito pacienti musí být vždy po čase monitorováni, dokud se diagnóza toxoplazmózy definitivně nepotvrdí nebo nevyloučí.
3. Proužky se mohou jevit velmi různě: úzké, tlusté, více nebo méně zbarvené, intenzivní, apod. Při použití této techniky je doporučeno, aby se provedlo několik srovnání profilů se známými páry vzorků, abyste se seznámili s jejich odečtem.
Na začátku je doporučeno, aby odečet CIP-WB prováděli nezávisle dva pracovníci laboratoře. V případě nesouhlasné interpretace se musí provést kontrolní CIP-WB.
4. Hodně vysoké molekulové hmotnosti (MW) antigenních frakcí jsou velmi těsně v horní části stripu v zájmu lepšího rozlišování středních a spodních frakcí MW. Proužky MW > 120 kDa tudíž nelze použít na interpretaci stanovení: vzorky vykazující pouze tento profil nemohou být brány jako pozitivní.
5. Oproti tomu (vrozená toxoplazmóza) se "triplet" (tři velmi lehce rozpoznatelné proužky), lokovaný mezi 75 a 100 kDa, velmi často nachází na pozitivních CIP-WB IgM (viz "T" Obr. 1, strip č. 17 napravo).
6. Při narození (vrozená toxoplazmóza) buďte opatrní při jakémkoliv celkovém posílení intenzity proužků

(hemokoncentrace), které by mohlo napovídat existenci dalších proužků v pupečnickové krvi. Pokud séra vykazují pouze tento profil, je to považováno za negativní.

7. Oproti tomu (vrozená toxoplazmóza, okulární toxoplazmóza), významné zesílení (často šířkou i intenzitou) jednoho nebo dvou izolovaných proužků, zatímco jsou ostatní proužky stejné nebo slabší intenzity, je považováno za kritérium positivity.
8. Přirozené protilátky (vrozená toxoplazmóza):
Technika imunoblotu je extrémně citlivá a použitý antigen pro CIP-WB test byl vybrán pro multiplicitu antigenních proužků přítomných na stripu.
Množství publikací uvádí proužky vyvinuté imunoblotem u osob, které se zdánlivě nikdy nesetkaly s toxoplazmózou. Tyto protilátky (IgG a IgM) jsou pouze vzácně detekovány jinými technikami, ale velmi často detekovány imunoblotem. Mohou být způsobeny zkříženými reakcemi s protilátkami namířeny proti imunogenům, jejichž podstata dosud nebyla určena.
Z tohoto důvodu je souprava **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** test vyhrazena pro srovnávání profilů. (Pro potvrzení sérologie IgG použijte specifický **LDBIO TOXO II IgG** test, který je k tomu určen.)
Novorozenci nemají přirozené protilátky (jiné, než přenesené maternální protilátky), ale vznik přirozených protilátek se zvyšuje s věkem dítěte po 3 měsících; mezi 3 a 6 měsícem jsou nalezeny vzácně.
To je důvod proč je indikace pro CIP-WB IgG/IgM u postnatálního monitoringu úmyslně omezena na 3 měsíce pro IgG a 1 měsíc pro IgM: nespecifické proužky se fakticky objevují dříve pro IgM.
9. "Heat Shock protein" (vrozená toxoplazmóza):
Nespecifické úzké proužky slabé, ale variabilní intenzity, se mohou objevovat pro IgM až do 37 kDa. Jde o artefakt vztahující se k přípravě antigenu a nazývá se "Heat Shock protein". Je přítomen, jak u stripu matky, tak u dítěte, nicméně někdy se objevuje výrazněji u určitých sér při monitorování dítěte. Neberte tento proužek do úvahy.
10. CIP-WB (okulární toxoplazmóza): CIP-WB IgM se nepoužívá při diagnostice okulární toxoplazmózy. Nicméně, CIP-IgA představuje diagnostického zájmu. Pro více informací o CIP-IgA nás prosím kontaktujte.

OMEZENÍ POUŽITÍ

- Diagnózu infekčního onemocnění nelze stanovit na základě jediného výsledku testu.
- Pro stanovení diagnózy je nutné interpretovat sérologické výsledky podle dostupných informací (např. Epidemiologie, klinické, zobrazovací, biologické ...). Neměli by se používat k stanovení diagnózy pouze na základě jejich positivity.

PROVEDENÍ (viz odkazy na literaturu S. 11)

Tyto studie byly provedeny v nezávislé referenční laboratoři.

CIP-WB G+M: VROZENÁ TOXOPLAZMÓZA při narození (matka/dítě)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZ	NEG
KLINICKÁ DATA	POZ CT n = 54	41	13
	NEG CT n = 60	0	60

Tabulka 1: Provedení CIP-WB IgG/IgM při narození (n = 114):

Specifická = 100 %

Positivní prediktivní hodnota = 100 %

Citlivost = 76 %

Negativní prediktivní hodnota = 83 %

CIP-WB G+M: VROZENÁ TOXOPLAZMÓZA u postnatálního monitoringu (dítě D0/D20)

U 54 dětí předem testovaných při D0 (**Tabulka.1**), bylo 10 neinfikovaných dětí a 12 infikovaných dětí (n = 22) monitorováno do D20 a byly retrospektivně analyzovány testem **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **Při D0:** 4 ze 12 infikovaných dětí nevykazovaly profil odlišný od narození (falešná negativita).
- **Při D20:** pouze 1 dítě zůstalo negativní.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
KLINICKÁ DATA	POZ CT n = 12	11	1
	NEG CT n = 10	0	10

Tabulka 2: Provedení CIP-WB IgG/IgM při D20 (n = 22):

Specificita = 100 %

Pozitivní prediktivní hodnota = 100 %

Citlivost = 92 %

Negativní prediktivní hodnota = 91 %

CIP-WB IgG: OKULÁRNÍ TOXOPLAZMÓZA (sérum/slná tekutina)

Provedení níže je z meta-analýzy čtyřech studií publikovaných referenčními centry.

Tyto studie srovnávají provedení CIP-WB **IgG** s GWC (Goldmann Witmer Coefficient) a s PCR. Také ukázaly diagnostické provedení při kombinovaném spojení dvou nebo tří těchto technik.

Tyto čtyři studie všechny používaly LDBIO test podle doporučení v návodu na použití kitu.

Citlivost byla stanovena na 113 pacientech představujících klinicky ověřenou okulární toxoplazmózu. Specificita byla vypočtena z kontrolní populace, představující jiné oční stavy než infekci toxoplazmózy: okulární toxokariázu (n=5), virovou infekci (n=10), jiné infekce (n=4), neinfekční oční stavy (n=126), z toho katarakta (n=42).

Citlivost (Se)

Celková citlivost CIP-WB IgG je **62,8 %** (n=113), provedení je srovnatelné s GWC (Se=61,0 %, n=113) a lepší než PCR (Se=43,5 %, n=92, p=0,0028).

Kombinace CIP-WB s GWC a PCR zlepšuje citlivost diagnózy:

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

CIP-WB + GWC + PCR: 86,3 % (n=95, p=0,0001)

Specificita (Sp)

Celková specificita CIP-WB IgG je **92,8 %** (n=111), provedení je srovnatelné s GWC (Sp=94,2 %, n=139) a nižší než PCR (Sp=100 %, n=131, p=0,0009).

Kombinace dvou technik, CIP-WB IgG + GWC, lehce redukovala specificitu diagnostiky (Sp=91,1 %, n=101, p=0,32). Kombinace s PCR neměla vliv na specificitu.

Závěr

Imunotest **Toxoplasma WB IgG IgM** má vynikající výkon v diagnostice vrozené nebo oční toxoplazmózy.

U vrozené toxoplazmózy má CIP-WB G + M senzitivitu **76 %** [95CI 62-86 %] a specificitu **100 %** [95CI 92-100 %] při narození. Opakované testování v prvním měsíci života dále zvyšuje citlivost CIP-WB G + M.

U oční toxoplazmózy má CIP-WB IgG senzitivitu **62,8 %** [95CI 53,2-71,6 %] a specificitu **92,8 %** [95CI 85,9-96,6 %]. Kombinace s jinými technikami (GWC a / nebo PCR) zvyšuje diagnostický výkon.

Reprodukovatelnost

Byla testována reprodukovatelnost mezi sériemi a mezi šaržemi. V obou případech byl vztah séra k séru s ohledem na specifické proužky excelentní.

Interference

Přestože nebyla pozorována zkřížená reakce u hemolyzovaných, ikterických nebo lipidických sér, je doporučeno interpretovat výsledky z každého použití takových vzorků s opatrností.

ŘEŠENÍ POTÍŽÍ

"Proužky jsou slabé, s malým kontrastem": Určitá séra s nízkou koncentrací protilátek mohou dávat takové výsledky.

"Odstínované oblasti, více nebo méně zbarvené, lehce difuzní": Strip nebyl zcela ponořen do některé reagensie a neinkuboval se správně po celé délce. Zabarvení také může být v případě, kdy byl vzorek nanesen a nebyla vanička protřepána.

"Šum pozadí je výrazný, ztěžuje odečet": Promývání nebyla dostatečná nebo byla poslední inkubace příliš dlouhá. Zajistěte správnou techniku provedení, dodržujte doby promytí a jejich kvalitu. Zkraťte dobu poslední inkubace.

Výjimečně mohou některá séra reagovat nespecifickou vazbou. Pak nelze výsledek imunoblotu použít. Tento nespecifický šum pozadí může mít vliv pouze na část stripu, takže může být neinterpretovatelná pouze daná část.

"Během posledního kroku vyvíjení se objeví precipiát v roztoku": substrát se může částečně vysrážet (černé sraženiny) v pufu na konci vyvíjení. Tento fenomén neovlivní kvalitu vyvíjení, která musí normálně pokračovat. Poslední promytí destilovanou vodou eliminuje možné přítomné pevné částice.

BIBLIOGRAFIE

- 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).
- Ronday, 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).

UPOZORNENI NA AKTUALIZACI - čtěte pozorně

DATUM VYDÁNÍ	VERZE	SHRNUTÍ ÚPRAV
26/07/2021	Vs18	Odstranění bezpečnostního varování R5 - kontaktní e-mailová adresa – NaN3 EUH 032.
25/07/2022	Vs19	R6 bez NaN3. Proužek označený písmenem A. Možné použití činidel z různých šarží.
30/11/2022	Vs20	Nová 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