

TOXOPLASMA CE0459



Western Blot IgA

Test immunoblot de diagnostic *in vitro*
Technique manuelle / semi-automatisable

In vitro diagnostic Immunoblot assay
Semi-automated / manual technique

NOTICE D'UTILISATION

INSTRUCTIONS FOR USE - page 6

Cette notice est **complémentaire** de la notice du kit TOXOPLASMA WB IgG-IgM (**#TOP-WB24G, #TOP-WB12G, #TOP-WB96G**) et de celle du conjugué anti-IgA humaine (R8) (**#WB-IA30, #WB-IA60**).

Le CIP-IgA ne doit pas être réalisé sans avoir préalablement pris connaissance des notices respectives de ces deux produits.

These Instructions for Use are **complementary** to the TOXOPLASMA WB IgG-IgM Kit (**#TOP-WB24G, #TOP-WB12G, #TOP-WB96G**) and anti-IgA conjugate (R8) (**#WB-IA30, #WB-IA60**) Instructions for Use.

The CIP-IgA must not be performed without first reading both products Instructions for Use.

Retrouvez plus d'informations et les notices traduites dans votre langue
sur notre site internet www.ldbiodiagnostics.com

Find more information and translated IFU on our website at www.ldbiodiagnostics.com

INDICATION DU TEST : extension d'application du kit TOXOPLASMA WB IgG-IgM

La Comparaison de Profils Immunologiques (CIP-WB) IgA (CIP-IgA) est destinée au diagnostic de la toxoplasmose oculaire par comparaison du profil immunologique du sérum du patient et de son humeur aqueuse. Elle doit être réalisée **en complément** du CIP-IgG décrit dans le **kit TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

PRINCIPE DU TEST

Technique de Western Blot

Les antigènes *Toxoplasma gondii*, après séparation électrophorétique, ont été fixés par électro-transfert à la surface d'une feuille de nitrocellulose (appelée le transfert) qui est ensuite découpée en 24 bandelettes identifiées de 1 à 24.

Déroulement du test

Le CIP IgA doit être réalisé de façon complémentaire au CIP-IgG, dans le cadre d'une recherche de toxoplasmose oculaire.

Le test consiste à incuber séparément, **avec 2 bandelettes contiguës issues du même transfert**, les deux échantillons (sérums, humeur aqueuse) dont on veut comparer les profils immunologiques puis de les révéler par action successive du conjugué Phosphatase Alcaline - **anti-IgA humaines (R8)** et du substrat. Les antigènes reconnus par les anticorps spécifiques de **classe IgA** présents dans les échantillons sont ainsi révélés sous forme de bandes transversales violettes. La lecture se fait par comparaison successive des couples de bandelettes IgG puis IgA qui permet de noter la présence éventuelle de bandes révélées uniquement par l'un des échantillons et pas par l'autre (Cf. § Interprétation).

RÉACTIFS FOURNIS

Se référer aux notices d'utilisation de la trousse Toxoplasma WB IgG-IgM et du conjugué anti-IgA (R8).

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Le CIP-IgA s'effectue en utilisant la trousse **TOXOPLASMA WB IgG-IgM (réactifs R1, R2, R5 et R6)**, ainsi que le **conjugué IgA LDBIO Diagnostics (R8)**. Ne pas utiliser d'autres bandelettes ou d'autres réactifs.
- Se référer à la notice de la trousse **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

Remarque : Même si nos réactifs peuvent être utilisés sur automate pour immunoblots, les temps d'incubation du CIP-IgA sont différents de ceux des autres tests LDBIO et il est donc recommandé d'effectuer le CIP-IgA par technique manuelle.

CONDITIONS DE CONSERVATION ET PÉREMPTION

Se référer à la notice d'utilisation de la trousse **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** et à celle du **conjugué anti-IgA humaines (R8)**.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Se référer aux précautions d'emploi du kit **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**. Les consignes suivantes sont également applicables :

- Ne pas mélanger 2 flacons de conjugué IgA de numéro de lots différents.
- Il est préférable d'utiliser tous les réactifs d'un même lot. En cas d'utilisation de lots différents, en assurer la traçabilité.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Un minimum de 25µl de sérum et d'humeur aqueuse est nécessaire. Dans le cas particulier de l'humeur aqueuse, l'utilisation de 50µl permettra d'augmenter la sensibilité du test (Cf. § Mode opératoire).

Conserver les échantillons à 2-8°C. S'ils doivent être conservés plus d'une semaine, les congeler à -20 ± 5°C. Ne pas utiliser d'échantillon contaminé. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois.

MODE OPÉRATOIRE

Nota Bene : Il est recommandé d'utiliser le CIP-IgA en complément du CIP IgG. Si les volumes d'humeur aqueuse ne le permettent pas, il est recommandé de privilégier le CIP-IgG au CIP-IgA.

Suivre les étapes 1 à 4 du mode opératoire décrit dans la notice **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

5. Distribuer les échantillons selon le plan de distribution établi (étape 1). **Utiliser 25µl de sérum et 25 à 50µl (si possible) d'humeur aqueuse.** Agiter doucement la cuve après chaque dépôt. La placer sur un agitateur oscillant. Couvrir la cuve d'incubation avec du parafilm ou du papier aluminium.

Incuber sur la nuit (15h +/- 3h) à 20-26°C.

Suivre les étapes 6 à 12 décrites dans la notice **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- Il est indispensable d'arrêter en même temps la révélation des 2 bandelettes d'un même couple (sérum et humeur aqueuse) pour une même sous-classe d'anticorps mais on peut arrêter indépendamment celle des IgG ou des IgA (les IgA, en plus faible concentration, se révèlent habituellement plus lentement que les IgG).
- L'humeur aqueuse est généralement moins chargée en anticorps. Il faut laisser le temps à la réaction de se révéler correctement et ne pas craindre de voir les bandelettes sériques s'assombrir un peu plus.

Apparier côte à côte les bandelettes IgG et IgA de chaque couple d'échantillons dans l'ordre des numéros croissants, en suivant le plan de distribution établi (étape 1).

Il est strictement obligatoire d'effectuer la comparaison d'un couple d'échantillons à l'aide de bandelettes conjointes (numéros contigus) issues d'un même transfert (même numéro de série). Il est aléatoire de vouloir comparer des bandelettes distantes (ex : n°2 avec n°15). **Il est dangereux** (faux résultats) de vouloir comparer des bandelettes de kits différents (numéro de série de bandelettes différents).

CONTRÔLE QUALITÉ ET INTERPRÉTATION

Description des bandes

Un échantillon positif peut présenter de très nombreuses bandes situées entre 15 et 200 kDa. Seules les bandes d'un poids moléculaire inférieur à 120 kDa peuvent être utilisables pour la comparaison de profils.

Interprétation

CIP-WB IgA (toxoplasmose oculaire)

Lire les 2 bandelettes contiguës simultanément de haut en bas en notant toute bande antigénique présente dans l'humeur aqueuse et absente du sérum.

Toute bande de résolution bien définie, d'un Poids Moléculaire (PM) inférieur à 120 kDa et présente uniquement dans l'humeur aqueuse, témoigne de la synthèse locale d'anticorps anti-toxoplasme, en faveur d'une toxoplasmose oculaire.

Remarques très importantes

1. Les résultats du CIP-WB IgA doivent être interprétés au vu des autres renseignements cliniques, sérologiques, parasitologiques, épidémiologiques, imagerie médicale, afin d'établir le diagnostic de toxoplasmose oculaire.
2. Un résultat CIP-WB IgA négatif n'écarte pas le diagnostic de toxoplasmose oculaire. Ces patients doivent nécessairement être suivis dans le temps jusqu'à ce que le diagnostic de toxoplasmose puisse être définitivement confirmé ou écarté.
3. Les bandes peuvent être d'aspect très variable : fines, épaisses, plus ou moins colorées, intenses... Il est recommandé lors de la prise en main de cette technique de réaliser quelques comparaisons de profils sur des couples d'échantillons connus afin de se familiariser avec leur lecture. Il est également recommandé que la lecture des CIP-WB soit au début effectuée indépendamment par deux personnes dans le Laboratoire. En cas de discordance d'interprétation, un CIP-WB de contrôle doit être réalisé.
4. Les fractions antigéniques de très hauts poids moléculaires (PM) sont très resserrées en haut de la bandelette au profit d'une meilleure résolution des fractions de moyen et bas PM. Les bandes d'un PM > 120KD ne sont donc pas utilisables pour l'interprétation du test : les échantillons présentant uniquement de telles différences de profils ne peuvent être rendus positifs.

LIMITES DU TEST

- Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne peut pas être établi sur la base du résultat d'un seul test.
- Dans le but d'établir un diagnostic clinique, les résultats sérologiques doivent être interprétés en fonction des renseignements disponibles (ex : épidémiologie, clinique, imagerie, biologie...). Ils ne doivent pas faire poser le diagnostic devant leur seule positivité.

PERFORMANCES (cf. références bibliographiques)

Spécificité – Sensibilité

Protocole

Les performances du CIP-IgA s'appuient sur deux cohortes de patients, de deux CHU Français de référence. L'une des cohortes a fait l'objet d'une publication [Mathis et al, 2018]. Une étude portait sur 87 patients : 42 toxoplasmoses oculaires et 45 témoins atteints de maladies oculaires. L'autre portait sur 59 patients : 24 cas de toxoplasmose oculaire et 35 témoins.

Les performances du WB sont données en termes de sensibilité et spécificité. Les intervalles de confiance à 95% sont calculés avec la méthode de Wilson avec correction de la continuité.

Résultats

	Cas	Témoins	Total
WB+	21	0	21
WB-	45	80	125
Total	66	80	146

Table 1 : Performances du CIP-WB IgA

WB IgA Sensibilité = 31.8% [21.2-44.6%] WB IgA Spécificité = 100% [94.3-100%]

A noter que 7 sérums (10.6% [4.7-21.2%]) étaient positifs en IgA seuls et n'auraient pas été détectés par un CIP-IgG.

Conclusion

Le profil comparatif WB en IgA présente une excellente spécificité dans les deux séries de cas (100% [94.3-100%]).

Il présente une sensibilité faible (31.8% [21.2-44.6%]) mais peut être positif alors que le WB IgG est négatif dans environ 10% (10.6% [4.7-21.2%]) des cas de toxoplasmose oculaire. La recherche complémentaire d'IgA, en plus des IgG, dans le cadre d'une suspicion de toxoplasmose oculaire permet donc d'améliorer la sensibilité de la comparaison de profil en WB à 75.7% (50/66 [63.4%-85.1%]).

Reproductibilité

Les reproductibilités inter-séries et inter-lots ont été testées. Dans les deux cas, la corrélation sérum à sérum vis-à-vis des bandes spécifiques est excellente.

Interférences

Bien qu'aucune interférence particulière n'ait été relevée avec des sérums hémolysés, ictériques ou lipidiques, il est conseillé d'interpréter les résultats provenant de l'utilisation de tels échantillons avec prudence.

RÉSOLUTION DE PROBLÈMES

Se référer à la notice d'utilisation de **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

NOTIFICATION DE CHANGEMENT DE VERSION – A lire attentivement

DATE DE VERSION	VERSION	RÉSUMÉ DE LA MODIFICATION
09/08/2021	Vs 04	Durée incubation nocturne - Adresse mail de contact
28/09/2022	Vs 05	Indication R8 – Adresse LDBIO – présentation mode opératoire – utilisation réactifs de lots différents



TOXOPLASMA Western Blot IgA

INTENDED USE: extension of application for the TOXOPLASMA WB IgG-IgM kit

The Comparison of Immunological Profiles (CIP-WB) IgA (CIP-IgA) is intended for the diagnosis of ocular toxoplasmosis by comparison of the immunological profile of the patient's serum and aqueous humor. It must be performed **in addition** to the CIP-IgG described in the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM kit**.

PRINCIPLE OF THE TEST

Western Blot technique

The antigens of *Toxoplasma gondii*, once separated by electrophoresis, are bound by electroblotting to the surface of a nitrocellulose membrane (called the transfer) cut into 24 strips numbered from 1 to 24.

Conduct of the test

The CIP-IgA should be carried out in a complementary way to the CIP-IgG, as part of a search for ocular toxoplasmosis.

The test consists in incubating separately, **with 2 contiguous strips from the same transfer**, the two samples (sera, aqueous humor) whose immunological profiles are to be compared and then to reveal them by the successive action of the Alkaline Phosphatase – **anti-human IgA conjugate (R8)** and the substrate. The antigens recognized by the **specific IgA** class antibodies present in the samples are thus revealed in the form of purple transverse bands. The reading is made by successive comparison of the pairs of IgG and IgA strips, allowing to note the possible presence of strips revealed only by one of the samples and not by the other (Cf. § Interpretation).

REAGENTS SUPPLIED

Refer to Toxoplasma WB IgG-IgM and anti-IgA conjugate (R8) instructions for use.

ADDITIONAL MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- CIP-IgA is performed using the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM kit (reagents R1, R2, R5 and R6)** and the **LDBIO Diagnostics IgA conjugate (R8)** provided. Do not use any other test strips or reagents.
- Refer to the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM Kit Instructions for Use**.

Note: Although our reagents can be used on an automated immunoblot processor, incubation times of CIP-IgA are different from those of other LDBIO assays and it is therefore recommended to perform CIP-IgA by manual technique.

STORAGE AND STABILITY

Refer to the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM Kit** and **anti-IgA conjugate (R8)** Instructions for Use.

PRECAUTIONS FOR USE

Please refer to precautions for use of **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**. The following instructions also applies.

- Do not mix 2 vials of IgA conjugate of different batch number.
- It is preferable to use all reagents from the same batch. If different batches are used, ensure traceability.

SPECIMEN COLLECTION

A minimum of 25µl of serum and aqueous humor is required. In the particular case of aqueous humor, the use of 50µl will increase the sensitivity of the test (Cf. § Procedure).

Keep the samples at 2-8 °C until they are processed. If they need to be stored more than a week, freeze the samples at -20 ± 5 °C. Do not use a contaminated sample. Avoid freezing and thawing the samples repeatedly.

TEST PROCEDURE

Note Bene: It is recommended to use CIP-IgA in addition to CIP IgG. If the volumes of aqueous humor do not allow it, it is recommended to prefer CIP-IgG to CIP-IgA.

Follow steps 1 to 4 of the procedure described in the Instructions for Use **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

5. Distribute the samples according to the established distribution plan (step 1). **Use 25µl serum and 25-50µl (if possible) aqueous humor.** Gently shake the cell after each deposition. Place on an oscillating stirrer. Cover the incubation cell with parafilm or aluminum foil.

Incubate overnight (15h +/- 3h) at 20-26 °C.

Follow steps 6 to 12 described in the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** Instructions for Use.

- It is essential to simultaneously stop the color development of the 2 strips of a given pair for a given sub-class of antibodies, but one can independently stop that of the IgGs or IgAs (IgAs, in a lower concentration, usually develop more slowly than IgGs).
- Aqueous humor generally has a lower concentration of antibodies. The reaction must be allowed time to correctly develop and one should not be concerned to see the serum strips darken a little more.

Match, side-by-side, the IgG and IgA strips of each pair of samples in order of increasing numbers, by following the established distribution plan (step 1).

It is strictly mandatory to perform the comparison of a pair of samples using joint strips (contiguous numbers) from the same transfer (same serial number). It is unreliable to compare strips that are spaced far apart (e.g., no.2 with no.15). **It is dangerous** (false results) to compare strips from different kits (strips with different serial numbers).

QUALITY CONTROL AND INTERPRETATION

Description of the bands

A positive sample can present a significant number of bands located between 15 and 200 kDa. Only the bands with a molecular weight less than 120 kDa can be used to compare the profiles.

Interpretation

CIP-WB IgA (ocular toxoplasmosis)

Read the 2 contiguous strips simultaneously from top to bottom noting any antigenic strips present in the aqueous humor and absent from the serum.

Any well-defined resolution band, with a Molecular Weight (MW) less than 120 kDa and present only in the aqueous humor, indicates local synthesis of anti-toxoplasmosis antibodies, in favor of ocular toxoplasmosis.

Very important points

1. Results of CIP-WB IgA must be interpreted in conjunction with other clinical status, serological, parasitological, epidemiological, and medical imaging information in order to make the diagnosis of ocular toxoplasmosis.
2. A negative CIP-WB IgA result does not rule out the diagnosis of ocular toxoplasmosis. These patients should necessarily be followed up over time until the diagnosis of toxoplasmosis can be definitively confirmed or ruled out.
3. The bands can vary widely in appearance: thin, thick, more or less colored, intense... It is recommended when using this technique to carry out a few profile comparisons with known pairs of samples in order to become familiar with their reading. It is also recommended that the CIP-WB reading be initially performed independently by two people in the laboratory. In the event of a discrepancy in interpretation, a control IPC-WB should be performed.
4. The very high molecular weight (MW) antigenic fractions are very close together in the upper part of the strip in favor of better resolution of the medium and low MW fractions. The bands of MW > 120 kDa therefore cannot be used to interpret the assay: samples only presenting such profile differences cannot be returned as positive.

LIMITATION OF USE

- The diagnosis of an infectious disease cannot be established on the basis of a single test result.
- Serological results must be interpreted according to available information (e.g., epidemiology, clinical, imaging, biology...) in order to establish a diagnosis. They should not be used to make a diagnosis based on their positivity alone.

PERFORMANCES (see literature references)

Specificity - Sensitivity

Protocol

Performances of the CIP-IgA are based on two cohorts of patients from two reference French University Hospitals. One of the cohorts has been published [Mathis et al, 2018]. One study involved 87 patients: 42 ocular toxoplasmosis and 45 controls with ocular diseases. The other involved 59 patients: 24 cases of ocular toxoplasmosis and 35 controls.

The performance of the WB is given in terms of sensitivity and specificity. The 95% confidence intervals are calculated using the Wilson's method with continuity correction.

Results

	Cases	Controls	Total
WB+	21	0	21
WB-	45	80	125
Total	66	80	146

Table 1: Performances of CIP-WB IgA

WB IgA Sensibility = 31.8% [21.2-44.6%] WB IgA Specificity = 100% [94.3-100%]

Note that 7 sera (10.6% [4.7-21.2%]) were positive for IgA alone and would not have been detected by a CIP-IgG.

Conclusion

The comparative WB IgA profile shows excellent specificity in both case series (100% [94.3-100%]).

It has a low sensitivity (31.8% [21.2-44.6%]) but can be positive while WB IgG is negative in about 10% (10.6% [4.7-21.2%]) of cases of ocular toxoplasmosis. The complementary search for IgA, in addition to IgG, in the context of suspected ocular toxoplasmosis thus improves the sensitivity of the WB profile comparison to 75.7% (50/66 [63.4%-85.1%]).

Reproducibility

Inter-series and inter-lot reproducibility were tested. In both cases, the serum to serum correlation with respect to specific bands is excellent.

Interferences

Even though no particular cross-reaction has been observed with haemolysed, icteric or lipidic sera, it is recommended to interpret the results from the use of such samples with care.

TROUBLESHOOTING

Refer to **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** Instructions for Use.

BIBLIOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHY

- 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).
- Mathis, T. *et al.* Comparison of Immunoblotting (IgA and IgG) and the Goldmann-Witmer Coefficient for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis in Immunocompetent Patients. *Br J Ophthalmol.* 102 (10): 1454-58.
- 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).
- 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).
- Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2015).

UPDATE NOTIFICATION – Please read carefully

RELEASE DATE	VERSION	MODIFICATION SUMMARY
09/08/2021	Vs 04	Night time incubation - Contact email address
28/09/2022	Vs 05	R8 indication – LDBIO address – Test procedure presentation – Use of reagents from different batches.



NF EN ISO 13485

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