

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

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

In vitro diagnostic Immunoblot assay
Semi-automated / manual technique

#TOP-WB24GM: 24 tests

#TOP-WB12GM: 12 tests

#TOP-WB96GM: 96 tests

NOTICE D'UTILISATION

INSTRUCTIONS FOR USE - page 13

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

Find more information and IFU in your language on our website www.ldbiodiagnostics.com



INDICATION DU TEST

TOXOPLASMA WB IgG-IgM est un test immunoblot à usage unique de Comparaison des Profils Immunologiques (CIP-WB) IgG et IgM destiné au diagnostic de :

- La toxoplasmose congénitale à la naissance (J0) : CIP-WB G+M entre le sang maternel et le sang du cordon.
- La toxoplasmose congénitale en suivi postnatal (J+N) : CIP-WB G+M entre le sang du cordon à J0 et le sang de l'enfant à J+N.
- La toxoplasmose oculaire : CIP-WB IgG entre le sérum du patient et l'humeur aqueuse.

Ce test n'est pas destiné au dépistage ou à la confirmation de sérologies isolées. Pour cette application, utiliser le test **LDBIO TOXO II IgG** (Ref. TOXO II IgG WB).

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

Nota bene : Les tests immunoblot IgG ou IgM décrits ci-dessous sont menés simultanément lors de la manipulation.

Immunoblot IgG

Le test consiste à incuber séparément, **avec 2 bandelettes contiguës issues du même transfert**, les deux échantillons (sérum, humeur aqueuse) dont on veut comparer les profils immunologiques.

- Etape 1 : Chaque échantillon sérique (ou humeur aqueuse) à tester est incubé séparément avec une bandelette. Les anticorps spécifiques éventuellement présents dans le prélèvement se fixent sélectivement sur les antigènes.
- Etape 2 : le conjugué Phosphatase Alcaline - **anti-IgG humaines** se lie aux anticorps fixés.
- Etape 3 : les immunocomplexes réagissent avec le substrat. Les antigènes reconnus par les anticorps spécifiques de **classe IgG** présents dans les échantillons sont ainsi révélés sous forme de bandes transversales violettes.

Immunoblot IgM

Le test est identique dans son principe, en remplaçant à l'étape 2 le conjugué précédent par un conjugué Phosphatase Alcaline – **anti-IgM humaine**. La révélation mettra donc en évidence les bandes antigéniques reconnues par les anticorps spécifiques **de classe IgM** présents dans les échantillons.

Lecture

La comparaison successive des couples de bandelettes IgG puis IgM permet de noter la présence éventuelle de bandes révélées uniquement par l'un des échantillons et pas par l'autre (cf. § Interprétation).

RÉACTIFS FOURNIS

Par défaut : conditionnement 24 tests (#TOP-WB24GM)

Italique : conditionnement 12 tests (#TOP-WB12GM) – **Gras** : conditionnement 96 tests (#TOP-WB96GM)

| ID | Qté | Description | Composition |
|----|-----|--|---|
| R1 | 1 | Pochette(s) de 24 (<i>12, 4x24</i>) BANDELETTES prédécoupées + Standards colorés. (Chaque pochette et chaque transfert est identifié par un numéro de série unique) | Nitrocellulose sensibilisée. Poids Moléculaires Colorés (kDa) : Bleu : 250, bleu : 150, bleu : 100, rose : 75, bleu : 50, vert : 37, rose : 25, bleu : 20, bleu : 15. |
| R2 | 1 | Flacon de 30 (<i>30, 125</i>) mL de DILUANT ECHANTILLON (Prêt à l'emploi - solution rose). | Tampon + surfactant. |
| R3 | 1 | Flacon(s) de 30 (<i>30, 60</i>) mL de CONJUGUE ANTI-IgG (Prêt à l'emploi - solution bleue). | Tampon + sérum polyclonal de chèvre anti-IgG humaines conjugué à la phosphatase alcaline + NaN3 (inf. 0,1%) + stabilisants. |
| R4 | 1 | Flacon(s) de 30 (<i>30, 60</i>) mL de CONJUGUE ANTI-IgM (Prêt à l'emploi - solution jaune). | Tampon + sérum polyclonal de chèvre anti-IgM humaines conjugué à la phosphatase alcaline + NaN3 (inf. 0,1%) + stabilisants. |
| R5 | 1 | Flacon de 30 (<i>30, 125</i>) mL de SUBSTRAT (Prêt à l'emploi - flacon opaque marron). | Tampon + NBT + BCIP + stabilisants. |
| R6 | 1 | Flacon de 60 (<i>60, 250</i>) mL de TAMPON DE LAVAGE CONCENTRE 10X (A diluer 10 fois dans de l'eau distillée - solution incolore). | Tampon + surfactant. |

R1 : La lettre devant chaque numéro de bandelette est spécifique du paramètre

R2, R3, R4, R5 et R6 sont communs à tous les kits LDBIO Diagnostics et présentent un numéro de lot unique qui ne dépend que de la date de leur production. **Il est recommandé de réaliser des séries multiparamétriques (cf. gamme immunoblots LDBIO Diagnostics) pour limiter le nombre de flacons entamés et pour assurer un meilleur contrôle de qualité.**

R3, R4 (NaN3) : EUH 032 - Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique

EUH 210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande ainsi que sur notre site internet www.ldbiodiagnostics.com

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Une cuve d'incubation multicanaux en polypropylène adaptée aux miniblots (#WBPP-08 ou équivalent).
- Un agitateur oscillant pour immunoblots, un système d'aspiration pour les liquides (les cuves LDBIO #WBPP-08 que nous fournissons peuvent être vidées par simple retournement).
- Tubes et matériel pour le prélèvement des échantillons, éprouvettes graduées, récipients adaptés. Pipettes automatiques, micropipettes et pointes à usage unique (volumes de 10 µL, 25µL, 1,2mL et 2mL).
- Eau distillée ou déionisée. Papier absorbant (ex : papier filtre Whatman), ruban adhésif transparent.
- Gants, pincette pour manipuler les bandelettes, cutter ou scalpel, règle plate transparente.

Remarque : Nos réactifs peuvent être utilisés sur automate pour immunoblots. **Attention aux possibles contaminations chimiques de nos réactifs si l'automate est partagé avec des réactifs d'un autre fabricant** (exemple connu : contamination par le TWEEN 20) et aux contaminations bactériologiques. Dédier des flacons à l'automate. Ne pas rempoter les réactifs en fin de manipulation.

CONDITIONS DE CONSERVATION ET PÉREMPTION

Conservation entre 2°C et 8°C. Les réactifs du coffret sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le couvercle de la boîte et sur les étiquettes des flacons, en l'absence de contamination. Ne pas utiliser de réactif contaminé ou trouble. Le tampon de lavage dilué 1/10 est stable pendant 2 mois à +2-8°C et pendant une semaine à température ambiante.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Sécurité

- Pour usage *in vitro* exclusivement. Pour usage professionnel uniquement. Réservé à un personnel formé à la technique. Manipuler selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et considérer tout réactif et tout échantillon comme potentiellement toxique et/ou infectieux.
- Porter une blouse, des gants et lunettes de protection, ne pas boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ne pas pipeter avec la bouche.
- Le substrat contient un mélange NBT et BCIP, toxique par contact (peau et muqueuses) et inhalation.
- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium susceptible de former des sels métalliques explosifs avec le plomb ou le cuivre. Rincer à l'eau tout rejet à l'évier.
- Éliminer les déchets (prélèvements, pointes, tubes, liquides de lavage, réactifs usagés...) conformément aux bonnes pratiques en usage dans la profession et aux règlements en vigueur dans le pays.
- Tout incident grave doit faire l'objet d'une déclaration auprès du fabricant et de l'autorité compétente.

Précautions

- Lire et interpréter les résultats sous une lumière blanche et directe.
- Il est préférable d'utiliser tous les réactifs d'un même lot. En cas d'utilisation de lots différents, en assurer la traçabilité.
- Utiliser les bandelettes dans leur ordre numérique. Ne pas mélanger des bandelettes de plusieurs numéros de série mais utiliser les transferts successivement. Etablir un plan de distribution précis avant de commencer la manipulation.
- Ne pas toucher les bandelettes avec les doigts, utiliser une pincette.
- Les réactifs doivent être bien mélangés avant usage, en particulier le tampon de lavage concentré.
- Refermer les flacons après usage, ne pas utiliser en cas de pénétration accidentelle de substance dans les réactifs. Ne pas utiliser de réactif provenant d'un flacon présentant des signes de fuite. Ne pas utiliser de solution trouble ou précipitée.
- N'utiliser que des cônes de pipette à usage unique. Eviter toute contamination inter-puits. Attention à la formation de mousse/bulles dans les cônes de pipette (contamination bactérienne des réactifs).

- Ne jamais nettoyer les cuves d'incubation à la javel ou au détergent. Utiliser seulement de l'eau distillée ou déionisée.
- L'omission de distribution d'un échantillon ou la distribution d'un volume inapproprié peut faire considérer comme négatif ou positif le résultat du test quel que soit son statut réel.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Prélever de manière aseptique les échantillons sur tube sec. Un minimum de 35µL de sérum et de 10 µL d'humeur aqueuse est nécessaire. Dans le cas particulier de l'humeur aqueuse, l'utilisation de 25 µL 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.

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.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Tampon de lavage : Pour 4 tests, diluer dans un flacon propre 10mL de tampon de lavage concentré 10x (R6) dans 90mL d'eau distillée ou déionisée. Attention à bien mélanger le tampon dilué.

MODE OPÉRATOIRE

Nota Bene : Il est recommandé de réaliser des séries multiparamétriques (cf. gamme immunoblots LDBIO Diagnostics) pour limiter le nombre de flacons entamés et pour assurer un meilleur contrôle de qualité.

1. Etablir le plan de distribution des échantillons.

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 très espacées (ex : n°2 avec n°15). **Il est dangereux** (faux résultats) de vouloir comparer des bandelettes de kits différents (N° de série de bandelettes différent).

2. Découper le nombre de bandelettes (R1) nécessaires, à l'aide d'un scalpel et d'une règle plate transparente, propre et sèche, en conservant le trait bleu de positionnement sur les bandelettes : les maintenir fermement plaquées par la règle et les découper du côté de la souche (les numéros étant visibles au travers de la règle par transparence).
3. Distribuer 1,2mL de tampon échantillon (R2) dans chacun des puits selon le plan établi.
4. Déposer dans leur ordre numérique les bandelettes numérotées dans les puits : laisser les bandelettes se réhydrater à la surface du tampon pendant environ 2 minutes, numéro visible vers le haut PUIS agiter doucement la cuve afin de les immerger totalement dans le tampon.
5. Distribuer les échantillons selon le plan établi (étape 1) et les volumes ci-dessous :

| | Sérum | Humeur aqueuse |
|-----|-------|----------------|
| IgG | 10µL | 10 ou 25µL |
| IgM | 25µL | - |

Dans le cas particulier de l'humeur aqueuse, l'utilisation de 25 µL permettront d'augmenter la sensibilité du test. Agiter doucement la cuve après chaque dépôt. La placer sur un agitateur oscillant.

Incubation 90 minutes ± 5minutes à 20-26°C.

6. Lavage : vider le contenu des puits à l'aide d'une pipette pasteur ou par retournement de la cuve d'incubation. Répartir 2 à 3 mL de tampon de lavage dilué dans chacun d'eux et incuber 3 minutes sur

l'agitateur. Répéter 2 fois, puis vider le contenu des puits. Faire attention à ce que les bandelettes ne se retournent pas dans leurs puits au cours de ces opérations.

7. Distribuer selon le plan de distribution établi 1,2 mL de conjugué anti-IgG (R3) ou 1,2mL de conjugué anti-IgM (R4) dans chacun des puits correspondants. Placer la cuve sur l'agitateur oscillant. **Incubation 60 minutes** ± 5 minutes à 20-26°C.
8. Lavage : procéder comme pour l'étape 6.
9. Distribuer 1,2 mL de substrat NBT/BCIP (R5) dans chacun des puits et placer sur l'agitateur oscillant, à l'abri de la lumière directe. **Incubation 60 minutes** ± 5 minutes à 20-26°C.

Quel que soit le paramètre, surveiller le développement de la coloration. La révélation peut être interrompue si la couleur du fond de la bandelette s'assombrit au point de rendre la lecture difficile (La qualité des lavages a une influence fondamentale sur cette coloration). Noter que les bandelettes s'éclairciront en séchant.

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

10. Arrêter la réaction par aspiration du substrat avec une pipette pasteur ou par retournement de la cuve d'incubation puis par la distribution de 2mL d'eau distillée ou déionisée dans les puits. Répéter une fois ce dernier lavage.
11. Séchage des bandelettes : les puits toujours remplis d'eau, saisir les bandelettes par leur extrémité numérotée à l'aide de la pincette et les déposer, numéro visible, sur un papier absorbant de type Whatman. Les laisser sécher à l'air. La couleur des bandelettes s'éclaircit naturellement en séchant. La lecture ne doit s'effectuer qu'après séchage complet.
12. Stockage : transférer les bandelettes sur la feuille de papier qui servira à les archiver. Aligner les traits de positionnement bleus. Pour cela, maintenir les bandelettes avec la règle plate et les coller par le haut à l'aide du ruban adhésif transparent.

Apparier côte à côte les bandelettes IgG et IgM 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 différent).

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 IgG/IgM (toxoplasmose congénitale)

- A la naissance (couples Mère / Enfant) :

Comparer indépendamment les bandelettes IgG et les bandelettes IgM. Lire les 2 bandelettes contiguës simultanément de haut en bas en notant toute bande antigénique **présente** dans le sang du cordon **et absente** du sérum maternel.

Toute bande de résolution bien définie, d'un Poids Moléculaire (PM) inférieur à 120 kDa et *présente uniquement chez l'enfant*, témoigne de la synthèse par l'enfant d'anticorps anti-toxoplasme, en faveur d'une toxoplasmose congénitale.

- Lors du suivi postnatal (couples Enfant J0 / Enfant J+N) :

Comparer indépendamment les bandelettes IgG et les bandelettes IgM.

Lire les 2 bandelettes contiguës simultanément de haut en bas en notant toute bande antigénique **présente** dans le sérum à J+N **et absente** du sang du cordon.

Toute bande de résolution bien définie, d'un PM < 120 kDa et *présente uniquement à J+N*, témoigne de la synthèse par l'enfant d'anticorps anti-toxoplasme, en faveur d'une toxoplasmose congénitale.

Nota Bene : L'indication du CIP-WB IgG/IgM dans le suivi postnatal est volontairement limitée à 3 mois en IgG et à 1 mois en IgM.

Remarque : La juxtaposition du standard de poids moléculaires coloré (pochette R1) permet d'estimer le PM des bandes antigéniques révélées (il faut auparavant le découper à l'aide d'une règle et d'un scalpel comme une bandelette ordinaire et le manipuler avec une pincette).

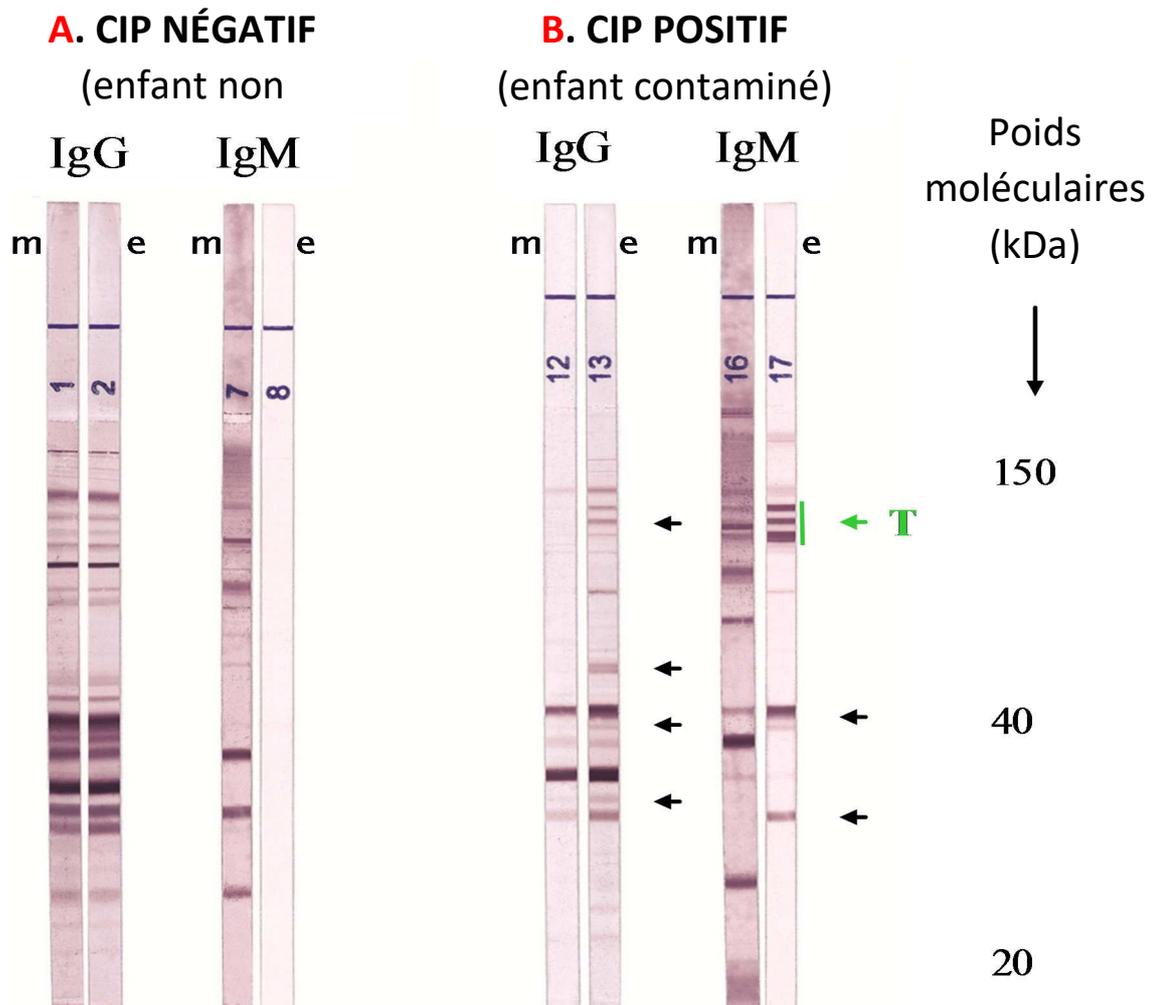


Fig. 1 : Toxoplasmose congénitale - exemples de résultats positifs et négatifs (m= mère ; e= enfant)

Les profils sont donnés à titre d'exemple. Les bandelettes comportent à partir du lot « 00011 » la lettre « A » spécifique du paramètre.

Le couple mère-enfant (A) correspond à une mère contaminée pendant la grossesse mais dont l'enfant est indemne : les profils IgG sont strictement identiques (IgG transmises) ; il n'y a aucune bande supplémentaire présente sur les bandelettes IgG et/ou IgM de l'enfant : **LE CIP-WB EST NEGATIF**.

Le couple (B), toxoplasmose congénitale, correspond à une mère contaminée durant sa grossesse et dont l'enfant a été également contaminé. Outre les anticorps transmis, on remarque parfaitement sur les bandelettes de l'enfant la présence de bandes supplémentaires (←), en IgG et/ou en IgM, correspondant aux anticorps néo-synthétisés par l'enfant : **LE CIP-WB EST POSITIF**.

CIP-WB IgG (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.

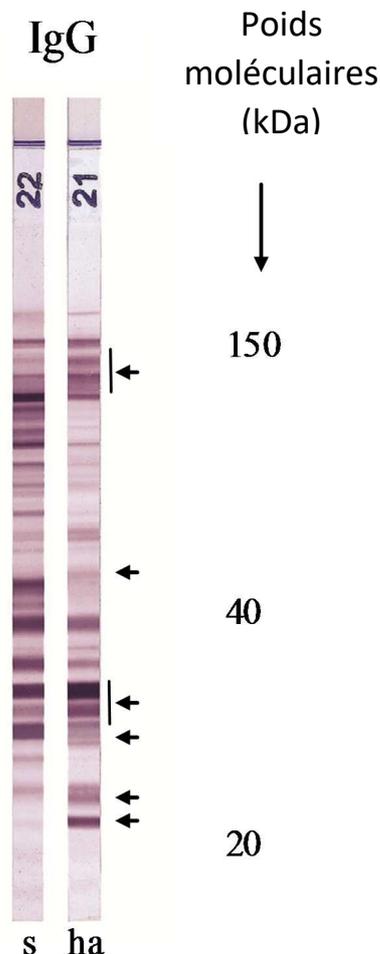


Fig. 2 : Toxoplasmose oculaire - Exemple de résultat positif – (s= sérum ; ha= humeur aqueuse)

Les profils sont donnés à titre d'exemple. **Les bandelettes comportent à partir du lot « 00011 » la lettre « A » spécifique du paramètre.**

Remarques très importantes

1. Les résultats du CIP-WB IgG/IgM doivent être interprétés au vu des autres renseignements cliniques, sérologiques, parasitologiques, épidémiologiques, imagerie médicale, afin d'établir le diagnostic de toxoplasmose congénitale ou oculaire.
2. Un résultat CIP-WB IgG/IgM négatif n'écarte pas le diagnostic de toxoplasmose congénitale ou 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 PM sont très resserrées en haut de la bandelette au profit d'une meilleure résolution des fractions de moyens et bas PM. Les bandes d'un PM > 120 kDa ne sont donc pas utilisables pour l'interprétation du test : les échantillons présentant uniquement de telles différences de profils ne peuvent être rendus positifs.
5. En opposition (toxoplasmose congénitale), une "triplette" (trois bandes très facilement reconnaissables) située entre 75 et 100 kDa est très souvent retrouvée sur les CIP-WB IgM positifs (voir « T » Fig. 1 bandelette N° 17 à droite).
6. A la naissance (toxoplasmose congénitale), il faut se méfier particulièrement de tout renforcement général d'intensité des bandes (hémococoncentration) qui pourrait faire croire à des bandes supplémentaires dans le sang du cordon. Les sérums présentant uniquement de telles différences de profils sont rendus négatifs.
7. Par opposition (toxoplasmose congénitale, toxoplasmose oculaire), Le renforcement significatif (souvent en largeur et en intensité) d'une ou deux bande(s) isolée(s) alors que toutes les autres bandes sont d'intensité identique ou plus faible, est considéré comme un critère de positivité.
8. Anticorps naturels (toxoplasmose congénitale) :
 La technique d'immunoblot est extrêmement sensible et l'antigène utilisé pour le test CIP-WB a été sélectionné pour la multiplicité de bandes antigéniques présentes sur la bandelette.
 De nombreuses publications font état de bandes révélées par immunoblot chez des personnes n'ayant apparemment jamais contracté la toxoplasmose. Ces anticorps (IgG et IgM) ne sont que rarement détectés par les autres techniques mais le sont très fréquemment par immunoblot. Cela serait dû à des réactions croisées avec des anticorps dirigés contre des immunogènes de nature encore non déterminée.
 C'est la raison pour laquelle l'indication du test **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** est réservée à la comparaison de profils (pour la confirmation des sérologies IgG, n'utiliser que le test **LDBIO TOXO II IgG** qui est spécifique et destiné à cet usage).
 Les nouveau-nés ne présentent pas d'anticorps naturels (autres que des anticorps maternels transmis) mais la probabilité d'apparition des anticorps naturels augmente avec l'âge du nourrisson après 3 mois; ils ne sont que rarement retrouvés entre 3 et 6 mois.
 C'est la raison pour laquelle l'indication du CIP-WB IgG/IgM dans le suivi postnatal est volontairement limitée à 3 mois en IgG et à 1 mois en IgM : l'apparition de bandes non spécifiques est en effet plus précoce en IgM.
9. « Heat Shock Protein » (toxoplasmose congénitale):
 Une bande fine non spécifique, d'intensité faible mais variable, peut être présente en IgM à hauteur de 37 kDa. Il s'agit d'un artefact lié à la préparation de l'antigène et appelé « Heat Shock Protein ». Présente à la fois sur les deux bandelettes du couple mère-enfant, elle peut parfois cependant apparaître plus prononcée avec certains sérums lors du suivi de l'enfant. Ne pas tenir compte de cette bande.
10. CIP-WB (toxoplasmose oculaire) : Le CIP-WB IgM n'est d'aucune utilité dans le diagnostic de la toxoplasmose oculaire. En revanche, le CIP-IgA présente un intérêt diagnostique. Pour plus de renseignement sur le CIP-IgA, merci de prendre contact avec nous.

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 sur leur seule positivité.

PERFORMANCES (cf. références bibliographiques p24)

Ces études ont été menées par des laboratoires de référence indépendants.

CIP-WB IgG/IgM : Toxoplasmose congénitale à la naissance (Mère / Enfant)

| | | TOXOPLASMA WB IgG-IgM | |
|-----------|-------------|-----------------------|-----|
| | | POS | NEG |
| DONNÉES | TC POS n=54 | 41 | 13 |
| CLINIQUES | TC NEG n=60 | 0 | 60 |

Table 1 : Performances du CIP-WB IgG/IgM à la naissance (n = 114)

Spécificité = 100%

Valeur Prédictive Positive = 100%

Sensibilité = 76%

Valeur Prédictive Négative = 83%

CIP-WB IgG/IgM : Toxoplasmose congénitale en suivi postnatal (Enfant J0 / J20)

Parmi les 54 enfants précédemment testés à J0 (**Table 1**), 10 enfants indemnes et 12 enfants contaminés (n=22) ont été suivis à J20 et analysés rétrospectivement avec le test **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **A J0 :** 4 enfants parmi les 12 enfants contaminés ne présentaient pas de profil différent à la naissance (faux négatifs).
- **A J20 :** 1 seul demeure négatif.

| | | TOXOPLASMA WB IgG-IgM | |
|-----------|-------------|-----------------------|-----|
| | | POS | NEG |
| DONNÉES | TC POS n=12 | 11 | 1 |
| CLINIQUES | TC NEG n=10 | 0 | 10 |

Table 2 : performances du CIP-WB IgG/IgM à J20 (n = 22)

Spécificité = 100%

Valeur Prédictive Positive = 100%

Sensibilité = 92%

Valeur Prédictive Négative = 91%

CIP-WB IgG : Toxoplasmose oculaire (sérum / humeur aqueuse)

Les performances indiquées ci-dessous proviennent de la méta-analyse de 4 études publiées par des centres de référence.

Ces études comparent les performances du CIP-WB **IgG** à celles du coefficient de Goldmann Witmer (GWC) et à celles de la PCR. Elles indiquent également les performances diagnostiques obtenues par l'association combinée de 2 ou 3 de ces techniques.

Ces quatre études ont toutes utilisé le test LDBIO Diagnostics selon les recommandations de la notice du kit.

La sensibilité a été déterminée sur 113 patients présentant une toxoplasmose oculaire cliniquement prouvée. La spécificité a été calculée sur une population témoin présentant une affection oculaire autre que l'infection toxoplasmique : toxocarose oculaire (n=5), infection virale (n=10), autres infections (n=4), affections oculaires non infectieuses (n=126) dont cataracte (n=42).

Sensibilité (Se)

La sensibilité globale du CIP-WB IgG est de **62,8%** (n=113), performance comparable au GWC (Se=61,0%, n=113) et supérieure à la PCR (Se=43,5%, n=92, p=0,0028).

L'association du CIP-WB au GWC et à la PCR permet d'améliorer la sensibilité du diagnostic :

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

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

Spécificité (Sp)

La spécificité globale du CIP-WB IgG est de **92,8%** (n=111), performance comparable au GWC (Sp=94,2%, n=139) et inférieure à la PCR (Sp=100%, n=131, p=0,0009).

L'association des deux techniques CIP-WB IgG + GWC réduit de manière non significative la spécificité du diagnostic (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). L'association à la PCR n'influe pas sur la spécificité.

Conclusion

Le test **Toxoplasma WB IgG IgM** par comparaison de profil immunitaire présente d'excellentes performances dans le cadre du diagnostic d'une toxoplasmose congénitale ou oculaire.

Dans le cadre de la toxoplasmose congénitale, le CIP-WB G+M présente une sensibilité de **76%** [IC95 62-86%] et une spécificité de **100%** [IC95 92-100%] à la naissance. Un recontrôle dans le premier mois de vie augmente encore la sensibilité du CIP-WB G+M.

Dans le cadre de la toxoplasmose oculaire, le CIP-WB IgG présente une sensibilité de **62,8%** [IC95 53,2-71,6%] et une spécificité de **92,8%** [IC95 85,9-96,6%]. L'association avec d'autres techniques (GWC et/ou PCR) augmente les performances diagnostiques.

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

"Les bandes sont pâles et peu contrastées" : certains sérums très peu chargés en anticorps peuvent donner de tels résultats.

"Des zones d'ombre se voient, plus ou moins colorées, légèrement diffuses" : la bandelette n'était pas totalement immergée dans l'un des réactifs et n'a pas incubé correctement sur toute sa longueur. Des taches peuvent être également présentes à l'endroit du dépôt de l'échantillon si la cuve n'a pas été agitée après la distribution.

"Le bruit de fond est important, rendant la lecture très difficile" : les lavages ont été insuffisants ou la dernière incubation a été trop longue. S'assurer du bon déroulement technique du test, du respect des temps de lavage, de la qualité de l'eau. Diminuer le temps de la dernière incubation. Exceptionnellement, certains sérums peuvent réagir ainsi de façon non spécifique. Le résultat de l'immunoblot ne peut alors être rendu.

Ce bruit de fond non spécifique peut ne concerner qu'une partie de la bandelette, rendant les résultats ininterprétables sur cette partie seulement.

"Un précipité apparaît dans la solution lors de la dernière étape de révélation" : le substrat peut partiellement précipiter (flocons noirs) dans le tampon en fin de révélation. Ce phénomène n'altère en rien la qualité de la révélation qui doit être poursuivie normalement. Le lavage final à l'eau distillée élimine les particules solides éventuellement présentes.

BIBLIOGRAPHIE : page 23

NOTIFICATION DE CHANGEMENT DE VERSION – A lire attentivement

| DATE DE VERSION | VERSION | RÉSUMÉ DE LA MODIFICATION |
|-----------------|---------|--|
| 26/07/2021 | Vs18 | Suppression de l'avertissements sécurité R5 – Adresse mail de contact – NaN3 EUH 032. |
| 25/07/2022 | Vs19 | R6 sans NaN3. Bandelette identifiée par lettre A. Possibilité d'utilisation de réactifs de lots différents. |
| 02/10/2022 | Vs20 | Nouvelle adresse |

TOXOPLASMA Western Blot IgG IgM



INTENDED USE

TOXOPLASMA WB IgG-IgM is a single use immunoblot assay for the Comparison of Immunological Profiles (CIP-WB) for IgG and IgM that is intended to diagnose:

- Congenital toxoplasmosis at birth (D0): CIP-WB G+M between maternal blood and cord blood.
- Congenital toxoplasmosis in post-natal monitoring (D+N): CIP-WB G+M between the cord blood at D0 and the child's blood at D+N.
- Ocular toxoplasmosis: CIP-WB IgG between the patient's serum and aqueous humour.

This assay is not intended for screening or confirming isolated serologies. For that application, use the **LDBIO TOXO II IgG** test (ref. TOXO II IgG WB).

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

Nota bene: The IgG or IgM immunoblot assays described below are conducted simultaneously during manipulation.

IgG Immunoblot

The assay consists of separately incubating, **with 2 contiguous strips from the same transfer**, the two samples (sera or aqueous humour) for which a comparison of immunological profiles is desired.

- Step 1: Each serum (or aqueous humour) specimen to be tested is separately incubated with a strip. The specific antibodies potentially present in the sample selectively bind themselves onto the antigens.
- Step 2: The alkaline phosphatase-**anti human IgG** conjugate then binds itself to the bound anti-antibodies.
- Step 3: The immunocomplexes react with the substrate. The antigens recognized by the **IgG class** specific antibodies present in the samples are revealed as purple transversal bands.

IgM immunoblot

The principle of the assay is identical, but in step 2 the previous conjugate is replaced by an alkaline phosphatase-**anti-human IgM** conjugate. The colour development will therefore reveal the antigenic bands recognised by the specific **IgM class** antibodies present in the samples.

Reading

The successive comparison of pairs of IgG and then IgM strips allows to show the potential presence of bands that are only developed by one of the samples and not the other (cf. § Interpretation).

REAGENTS SUPPLIED

Default: package of 24 tests (#TOP-WB24GM)

Italic: package of 12 tests (#TOP-WB12GM) – **Bold**: package of 96 tests (#TOP-WB96GM)

| ID | Qty | Description | Composition |
|----|-----|---|---|
| R1 | 1 | Folder(s) of 24 (<i>12, 4x24</i>) STRIPS: precut + coloured Standards. (Each folder and each transfer is identified by a unique serial number) | Sensitized nitrocellulose. Coloured Molecular Weight (kDa): Blue: 250, Blue: 150, Blue: 100, Pink: 75, Blue: 50, Green: 37, Pink: 25, Blue: 20, Blue: 15. |
| R2 | 1 | Vial of 30 (<i>30, 125</i>) mL of SAMPLE BUFFER (Ready to use - pink solution). | Buffer + surfactant. |
| R3 | 1 | Vial(s) of 30 (<i>30, 60</i>) mL of ANTI IgG CONJUGATE (Ready to use - blue solution). | Buffer + anti-human IgG polyclonal goat sera conjugated with Alkaline Phosphatase + NaN3 (<0.1%) + stabilisers. |
| R4 | 1 | Vial(s) of 30 (<i>30, 60</i>) mL of ANTI-IgM CONJUGATE (ready to use - yellow solution). | Buffer + polyclonal goat anti-human IgM serum conjugated to alkaline phosphatase + NaN3 (< 0.1%) + stabilisers. |
| R5 | 1 | Vial of 30 (<i>30, 125</i>) mL of SUBSTRATE (Ready to use - opaque brown vial). | Buffer + NBT + BCIP + stabilisers. |
| R6 | 1 | Vial of 60 (<i>60, 250</i>) mL of WASH CONCENTRATE 10X BUFFER (<u>To be diluted 10 times</u> in distilled water - colourless solution). | Buffer + surfactant + NaN3 (<0.1%). |

R1: The letter before each strip number is specific to the parameter.

R2, R3, R4, R5 and R6 are common to all kits and have a unique lot number depending only on the date of their production. **It is recommended to perform multiparameter testing (see the LDBIO immunoblot range) to limit the number of vials opened and to ensure better quality control.**

R3, R4, (NaN3): EUH 032 - Contact with acids liberates very toxic gas.

EUH 210 Safety data sheet available on request as well as on our website www.ldbiodiagnostics.com

ADDITIONAL MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- One multi-channel polypropylene incubation trays for mini-blots (#WBPP-08 or equivalent).
- One rocking platform for immunoblots, one vacuum system for liquids (the #WBPP-08 tubs that we supply can be emptied by simply turning them over).
- Tubes and material for drawing the samples, graduated cylinders, adapted containers. Automatic pipettes, micropipettes and disposable tips (volumes of 10 μ L, 25 μ L, 1.2 mL and 2 mL).
- Distilled or deionised water. Absorbent paper (e.g., Whatman filter paper), transparent adhesive tape.
- Gloves, tweezers to handle the strips, cutter or scalpel, flat transparent ruler.

Note: Our reagents can be used in an automated immunoblot processor. **Care should be taken with possible chemical contaminations of our reagents if the processor is shared with reagents from another manufacturer** (known example: contamination by the TWEEN 20), and bacterial contaminations. Reserve vials for the processor. After processing, do not place the remaining used reagents back into the original vials.

STORAGE AND STABILITY

Store between 2 and 8°C. The reagents from the kit are stable until the expiry date indicated on the outer box and the vial labels. Do not use contaminated or cloudy reagent. Wash buffer diluted to 1/10 is stable for 2 months at +2 to +8 °C and one week at room temperature.

PRECAUTIONS FOR USE

Safety

- For *in vitro* use only. For professional use only. Only for technically trained personnel. Handle according to Good Laboratory Practices and consider any reagent and any sample as potentially toxic and/or infectious.
- Wear a lab coat, gloves and glasses; do not drink, eat or smoke in the laboratory. Do not mouth the pipettes.
- The substrate contains a mixture of NBT and BCIP, toxic on contact (skin and mucous membranes) and inhalation.
- The reagents contain sodium azide which can form explosive metallic salts with lead and copper. Rinse any spill with water.
- Dispose of waste (samples, tips, tubes, wash liquid, used reagent...) according to good practices used in the industry and current regulations in the country.
- Any serious incident must be the subject of a declaration to the manufacturer and the competent authority.

Precautions

- Read and interpret the results under direct white light.
- It is preferable to use all reagents from the same batch. If different batches are used, ensure traceability.
- Use the strips in numerical order. Do not mix strips from different serial numbers; use the transfers in succession. Establish a specific distribution plan before starting the test.
- Do not touch the strips with your fingers; use tweezers.
- The reagents must be mixed well before use, particularly the concentrated wash buffer.
- Close the vials after use; do not use if a substance was accidentally introduced in the reagents. Do not use reagent from a vial that presents signs of leakage. Do not use cloudy or precipitated solution.
- Use only disposable pipette tips. Avoid any inter-channel contamination. Watch for the formation of foam or bubbles in the pipette tips (bacterial contamination of reagent vials).
- Clean incubation trays only with distilled water (never use detergent or bleach).
- The omission of a sample or the distribution of an inadequate volume may render the test result negative or positive, regardless of its actual status.

SPECIMEN COLLECTION

Aseptically collect the samples in dry tubes. A minimum of 35 µL of serum or 10µL of aqueous humour is required. In cases of aqueous humour, using 25 µL will increase the sensitivity of the test (See § Test 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.

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.

PREPARATION OF REAGENTS

Wash buffer: For 4 tests, in a clean bottle, dilute 10 mL of Wash Concentrate 10X (**R6**) in 90 mL of distilled or deionised water. Be careful to mix the diluted buffer well.

TEST PROCEDURE

Nota Bene: It is recommended to perform multiparameter testing (see the LDBIO immunoblot range) to limit the number of vials opened and to ensure better quality control.

1. Prepare the sample distribution plan.

It is strictly mandatory to compare a pair of samples with joined strips (contiguous numbers) from a given 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).

2. Cut the required number of strips (R1) using a scalpel and a clean and dry flat transparent ruler, keeping the blue positioning line on the strips: hold the strips firmly in place with the ruler and cut them on the side of the stain (the numbers are visible through the ruler).
3. Distribute 1.2 mL of sample buffer (R2) in each channel according to the established plan.
4. Deposit, in their numerical order, the numbered strips in the channels: Let the strips rehydrate themselves at the surface of the buffer for approximately 2 minutes, with the number visible at the top, THEN gently shake the tray to totally immerse them in the buffer.
5. Dispense the samples according to the established distribution plan (step 1) and the following volumes:

| | Serum | Aqueous humour |
|-----|-------|----------------|
| IgG | 10µL | 10 or 25µL |
| IgM | 25µL | - |

In cases of aqueous humour, using 25 µL will increase the sensitivity of the test. Gently shake the tray after each dispense. Place the tray on a rocking platform.

Incubate for 90 minutes ± 5 minutes at 20-26 °C.

6. Wash step: Empty the contents of the channels with a Pasteur pipette or by turning the incubation tray over. Dispense 2 to 3 mL of diluted Wash Buffer in each channel. Incubate on the rocking platform for 3 minutes. Repeat 2 times, then empty the contents of the channels. Ensure that the strips don't turn during these steps.
7. Dispense, according to the established distribution plan, 1.2 mL of anti-IgG conjugate (R3) or 1.2 mL of anti-IgM conjugate (R4) in each of the corresponding wells. Place the tray on the rocking platform. **Incubate for 60 minutes ± 5 minutes** at 20-26 °C.
8. Wash step: repeat step 6.
9. Distribute 1.2 mL of NBT/BCIP substrate (R5) into each of the channels. Place on the rocking platform and protect from direct light. **Incubate for 60 minutes ± 5 minutes** at 20-26 °C.

Regardless of the parameter, monitor the development of the colour. The development can be stopped if the background colour of the strip darkens to the point where reading is difficult (the quality of the wash steps has a fundamental influence on the background coloration). Note that the strips will lighten as they dry.

- It is essential to simultaneously stop the colour development of the 2 strips of a given pair for a given subclass of antibodies, but one can independently stop that of the IgGs or IgMs (IgMs, in a lower concentration, usually develop more slowly than IgGs).
- Children's serum generally has a lower concentration of IgM. The reaction must be allowed time to correctly develop and one should not be concerned to see the maternal IgM strip darken a little more.
- Aqueous humour 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.

10. Stop the reaction by aspirating substrate with a Pasteur pipette or by turning the incubation tub over and dispensing 2 mL of distilled or deionised water in the channels. Repeat this last washing step one more time.
11. Drying the strips: With the channels still water-filled, take the strips by the numbered end using the tweezers and deposit them, with the number visible, onto a Whatman absorbent paper. Let air dry. The colour of the strips will naturally lighten while drying. Interpretation must only be performed after drying is complete.
12. Storage: Transfer the strips onto a sheet of paper, which will be used to archive them. Align the blue positioning lines. Keeping them in place with the flat ruler, stick the top of the strips with transparent adhesive tape.

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

It is strictly mandatory to compare a pair of samples with joined strips (contiguous numbers) from a given 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 G+M (congenital toxoplasmosis)

- At birth (mother/child pairs):

Independently compare the IgG strips and the IgM strips. Read the 2 contiguous strips simultaneously from top to bottom while noting any antigenic band that is **present** in the cord blood **and absent** from the maternal serum.

Any band that has a well-defined resolution, a Molecular Weight (MW) less than 120 kDa and that is *only present in the child* is evidence that the child has synthesised anti-toxoplasma antibodies, suggesting congenital toxoplasmosis.

- During post-natal monitoring (child D0/child D+N pairs):

Independently compare the IgG strips and the IgM strips. Read the 2 contiguous strips simultaneously from top to bottom while noting any antigenic band that is **present** in the serum at D+N **and absent** from the cord blood.

Any band that has a well-defined resolution, an MW < 120 kDa and that is *only present at D+N* is evidence that the child has synthesised anti-toxoplasma antibodies, suggesting congenital toxoplasmosis.

Nota bene: the indication of CIP-WB IgG/IgM in post-natal monitoring is intentionally limited to 3 months for IgG and 1 month for IgM.

Note: The juxtaposition of the stained molecular weight standard (folder R1) allows the MW of the developed antigenic bands to be estimated (it must be cut beforehand with a ruler and scalpel, like an ordinary strip, and handled with tweezers).

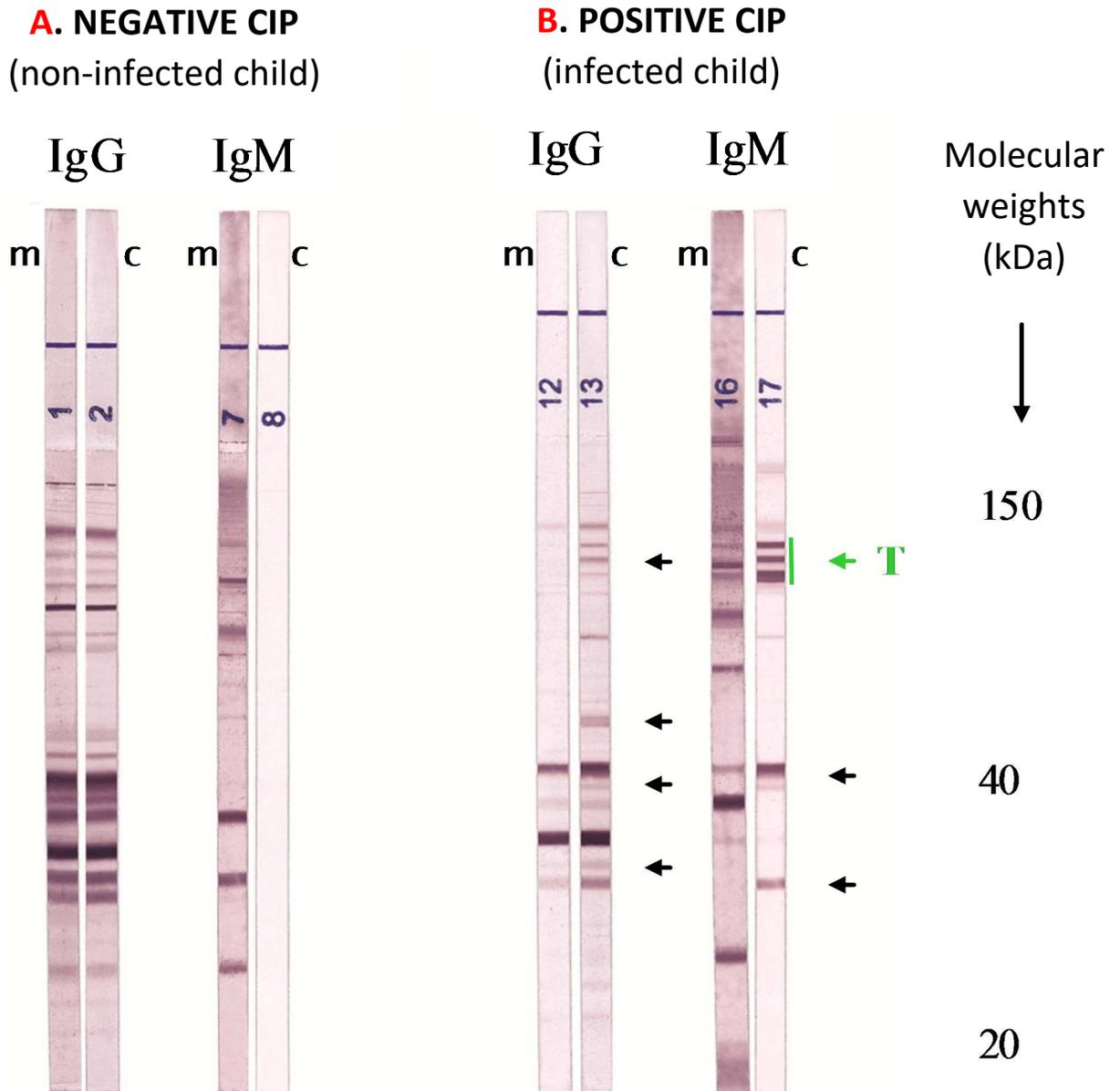


Fig. 1: Congenital toxoplasmosis - Examples of positive and negative results – (m= mother; c=child)

The profiles are given as examples. **The strips are marked with the letter "A" specific to the parameter from batch "00011".**

The mother-child pair (A) corresponds to a mother infected during pregnancy but whose child is uninfected: The IgG profiles are strictly identical (transmitted IgGs); there is no other additional band present on the child's IgG and/or IgM strips: **THE CIP-WB IS NEGATIVE.**

The pair (B), congenital toxoplasmosis, corresponds to a mother infected during her pregnancy and whose child was also infected. Besides the transmitted antibodies, one perfectly notes the presence of additional bands (←), for IgG and/or IgM, on the child's strips, corresponding to the antibodies newly synthesised by the child: **THE CIP-WB IS POSITIVE.**

CIP-WB IgG (ocular toxoplasmosis)

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

Any band that has a well-defined resolution, a Molecular Weight (MW) less than 120 kDa and that is *only present in the aqueous humour* evidences local synthesis of anti-toxoplasma antibodies, suggesting ocular toxoplasmosis.

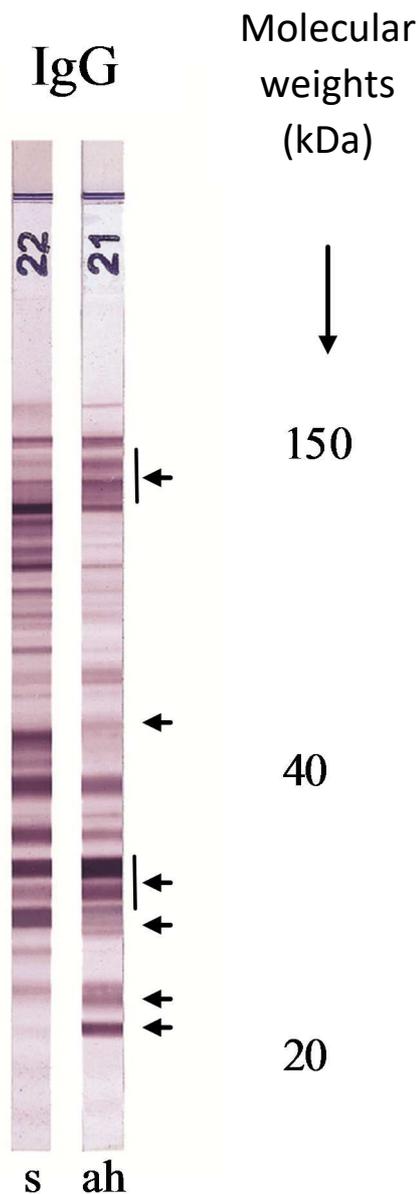


Fig. 2: Ocular toxoplasmosis - Example of positive result – (s=serum; ah= aqueous humor)

The profiles are given as examples. The strips are marked with the letter "A" specific to the parameter from batch "00011".

Very important points

1. The CIP-WB IgG/IgM results must be interpreted in light of other clinical, serological, parasitological, epidemiological and medical imaging information in order to establish the diagnosis of congenital or ocular toxoplasmosis.
2. A negative CIP-WB IgG/IgM result does not rule out the diagnosis of congenital or ocular toxoplasmosis. These patients must always be monitored over time until the diagnosis of toxoplasmosis can be definitively confirmed or ruled out.
3. The aspects of the bands can vary greatly: narrow, thick, more or less coloured, intense, etc.
When one takes on this technique, it is recommended that several comparisons of profiles be made with known pairs of samples in order to become familiar with their reading.
At the beginning, it is also recommended that the CIP-WB reading be done independently by two individuals in the laboratory. In case of discordant interpretations, a control CIP-WB must be performed.
4. The very high MW antigenic fractions are very close together in the upper part of the strip in favour 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.
5. In contrast (congenital toxoplasmosis), a “triplet” (three very easily recognisable bands) located between 75 and 100 kDa is very often found on positive CIP-WB IgMs (see “**T**” Fig. 1, strip No. 17 to the right).
6. At birth (congenital toxoplasmosis), one must pay particular attention to any general reinforcement of the intensity of the bands (haemoconcentration) that could suggest that additional bands exist in the cord blood. Sera only presenting such profile differences are returned as negative.
7. In contrast (congenital toxoplasmosis, ocular toxoplasmosis), significant reinforcement (often in width and intensity) of one or two isolated band(s), while all the other bands are of identical or weaker intensity, is considered to be a criterion for positivity.
8. Natural antibodies (congenital toxoplasmosis):
The immunoblot technique is extremely sensitive and the antigen used for the CIP-WB test was selected for the multiplicity of antigenic bands present on the strip.
Numerous publications mention bands developed by immunoblot in individuals who have apparently never contracted toxoplasmosis. These antibodies (IgG and IgM) are only rarely detected by other techniques but are very frequently detected by immunoblot. They could be due to cross-reactions with antibodies directed against immunogens of a nature that has yet to be determined.
This is why the indication for the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** test is reserved to comparing profiles. (To confirm IgG serologies, use the specific **LDBIO TOXO II IgG** test that is intended for that use)
New-borns do not present natural antibodies (other than transmitted maternal antibodies), but the likelihood of natural antibodies appearing increases with the infant’s age after 3 months; they are only rarely found between 3 and 6 months.
This is why the indication for CIP-WB IgG/IgM in post-natal monitoring is intentionally limited to 3 months for IgG and 1 month for IgM: non-specific bands do in fact appear earlier for IgM.
9. “Heat Shock Protein” (congenital toxoplasmosis):
A non-specific, narrow band of weak but variable intensity can be present for IgM up to 37 kDa. It is an artefact linked to the preparation of the antigen and called “Heat Shock Protein”. Present on both the strips of the mother-child pair, it can nevertheless sometimes appear to be more pronounced with certain sera during monitoring of the child. Do not take this band into account.
10. CIP-WB (ocular toxoplasmosis): The CIP-WB IgM is of no use in the diagnosis of ocular toxoplasmosis. However, the CIP-IgA is of diagnostic interest in that situation. For more information about CIP-IgA, please contact us.

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 P24)

These studies were conducted by independent reference laboratories.

CIP-WB G+M: Congenital toxoplasmosis at birth (mother/child)

| | | TOXOPLASMA WB IgG-IgM | |
|------------------|---------------|-----------------------|-----|
| | | POS | NEG |
| CLINICAL DATA | POS CT n = 54 | 41 | 13 |
| | NEG CT n = 60 | 0 | 60 |

Table 1: Performance of CIP-WB IgG/IgM at birth (n = 114)

Specificity = 100%

Positive predictive value = 100%

Sensitivity = 76%

Negative predictive value = 83%

CIP-WB G+M: Congenital toxoplasmosis in post-natal monitoring (child D0/D20)

Out of the 54 children previously tested at D0 (**Table 1**), 10 uninfected children and 12 infected children (n = 22) were monitored until D20 and retrospectively analysed with the **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** test.

- **At D0:** 4 out of 12 infected children did not present a profile different from birth (false negatives).
- **At D20:** 1 single child remains negative.

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

Table 2: Performance of CIP-WB IgG/IgM at D20 (n = 22)

Specificity = 100%

Positive predictive value = 100%

Sensitivity = 92%

Negative predictive value = 91%

CIP-WB IgG: Ocular toxoplasmosis (serum/aqueous humour)

The performances shown below are from the meta-analysis of four studies published by reference centres.

These studies compare the performances of CIP-WB **IgG** to those of the Goldmann Witmer Coefficient (GWC) and those of PCR. They also show the diagnostic performances obtained by the combined association of two or three of these techniques.

These four studies all used the LDBIO test in accordance with the recommendations in the kit's instructions for use.

Sensitivity was determined on 113 patients presenting clinically proven ocular toxoplasmosis. Specificity was calculated on a control population presenting an ocular condition other than toxoplasmic infection: ocular toxocariasis (n=5), viral infection (n=10), other infections (n=4), non-infectious ocular conditions (n=126) of which cataract (n=42).

Sensitivity (Se)

The overall sensitivity of CIP-WB IgG is **62.8%** (n=113), performance that is comparable to the GWC (Se=61.0%, n=113) and greater than PCR (Se=43.5%, n=92, p=0.0028).

The combination of CIP-WB with GWC and PCR improves the sensitivity of the diagnosis:

CIP-WB + GWC: Se = 78.1% (n=96, p=0.0082)

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

Specificity (Sp)

The overall specificity of CIP-WB IgG is **92.8%** (n=111), performance that is comparable to the GWC (Sp=94.2%, n=139) and less than PCR (Sp=100%, n=131, p=0.0009).

The combination of the two techniques, CIP-WB IgG + GWC, non-significantly reduces the specificity of the diagnosis (Sp=91.1%, n=101, p=0.32). Combination with PCR does not influence the specificity.

Conclusion

The **Toxoplasma WB IgG IgM** immunoassay has excellent performance in the diagnosis of congenital or ocular toxoplasmosis.

In congenital toxoplasmosis, the CIP-WB G+M has a sensitivity of **76%** [95CI 62-86%] and a specificity of **100%** [95CI 92-100%] at birth. Re-testing in the first month of life further increases the sensitivity of the CIP-WB G+M.

In ocular toxoplasmosis, CIP-WB IgG has a sensitivity of **62.8%** [95CI 53.2-71.6%] and a specificity of **92.8%** [95CI 85.9-96.6%]. Combination with other techniques (GWC and/or PCR) increases diagnostic performance.

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

"The bands are pale with little contrast": Certain sera with low concentrations of antibodies may give such results.

"Shaded areas can be seen, more or less coloured, slightly diffuse": The strip was not totally submerged in one of the reagents and did not incubate correctly along its entire length. Stains can also be present where the sample was deposited if the tray was not shaken after dispensing.

"The background noise is significant, making reading very difficult": The washes were insufficient, or the last incubation was too long. Ensure good test performance techniques, respect wash times and ensure water quality. Reduce the time of the last incubation. Exceptionally, certain sera may react in a non-specific manner. Then, the result of the immunoblot cannot be used.

This non-specific background noise may involve only part of the strip, making the results uninterpretable for that part only.

"A precipitate appears in the solution during the last step of development": the substrate may in fact partially precipitate (black flakes) in the buffer at the end of development. This phenomenon does not alter the quality of the development which must be continued normally. The last wash with distilled water eliminates the possible solid particles present.

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).
- 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).

UPDATE NOTIFICATION – Please read carefully

| RELEASE DATE | VERSION | MODIFICATION SUMMARY |
|--------------|---------|--|
| 26/07/2021 | Vs18 | Removal of security warning R5 - Contact email address – NaN3 EUH 032 |
| 25/07/2022 | Vs19 | R6 without NaN3. Strip identified by letter A. Possible use of reagents from different batches. |
| 30/11/2022 | Vs20 | New address |



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