

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

In-vitro-Diagnostik Immunoblot-Assay
Halbautomatische / manuelle Technik

#TOP-WB24GM: 24 tests

#TOP-WB12GM: 12 tests

#TOP-WB96GM: 96 tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Weitere Informationen und die Gebrauchsanweisung in Ihrer Sprache finden Sie auf unserer Website www.ldbiodiagnostics.com

VERWENDUNGSZWECK

TOXOPLASMA WB IgG-IgM ist ein Einwegtest für den Vergleich von IgG- und IgM-immunologischen Profilen mittels Immunoblot-Assay (CIP-WB), der zur Diagnose folgender Erkrankungen bestimmt ist:

- Kongenitale Toxoplasmose bei der Geburt (T0): CIP-WB G+M zwischen dem mütterlichen Blut und dem Nabelschnurblut.
- Kongenitale Toxoplasmose während der postnatalen Nachsorge (T+N): CIP-WB G+M zwischen dem Nabelschnurblut zum Zeitpunkt T0 und dem Blut des Kindes zum Zeitpunkt T+N.
- Okuläre Toxoplasmose: CIP-WB IgG zwischen dem Serum des Patienten und dem Kammerwasser.

Dieser Test ist nicht zur Erkennung oder Bestätigung isolierter Serologien bestimmt. Für diese Anwendung ist der Test **LDBIO TOXO II IgG** (Ref. TOXO II IgG WB) vorgesehen.

TESTPRINZIP

Western Blot-Technik

Die Antigene von *Toxoplasma gondii* werden nach der Trennung durch Elektrophorese mittels Elektroblothing an die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran gebunden (Transfer genannt), die in 24 von 1 bis 24 nummerierte Streifen geschnitten wird.

Durchführung des Tests

Anmerkung: Die IgG, oder IgM Immunoblot Tests werden bei der Anwendung zeitgleich durchgeführt.

Immunoblot IgG

Der Test besteht in der separaten Inkubation der Serumproben (oder Kammerflüssigkeit), deren immunologischen Profile verglichen werden sollen, **mit aneinandergrenzenden Streifen, die aus demselben Transfer** stammen.

- Schritt 1: Jede zu prüfende Serumprobe (oder Kammerwasser) wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Toxoplasma*-Antikörper binden selektiv an die Antigene von *T. gondii*.
- Schritt 2: Das alkalische Phosphatase **Anti-Human-IgG**-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Toxoplasma*-Antikörper.
- Schritt 3: Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Toxoplasma*-Antikörpern **der Klasse IgG** erkannten Antigene werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

Immunoblot IgM

Der Test ist seinem Prinzip nach identisch, in Schritt 2 wird das oben erwähnte Konjugat durch ein Alkalische Phosphatase - **Anti-Humanes IgM**-Konjugat ersetzt. Die Ermittlung wird folglich die Antigen-Banden nachweisen, die durch die in den Proben vorhandenen Toxoplasmose-Antikörper **der Klasse IgM** erkannt werden.

Auswertung

Der aufeinanderfolgende Vergleich der Streifen-Paare IgG und IgM ermöglicht das Feststellen des eventuellen Vorhandenseins von Banden, die sich nur in einer der Proben entwickeln, und nicht in der anderen (vgl. § Auswertung).

Enthaltene reagenzien

Standard: Packung mit 24 Tests (#TOP-WB24GM)

kursiv: Packung mit 12 Tests (#TOP-WB12GM) - **fett**: Packung mit 96 Tests (#TOP-WB96GM).

ID	Menge	Beschreibung	Zusammensetzung
R1	1	Block/Blöcke mit 24 (<i>12, 4 x 24</i>) STREIFEN: vorgeschchnittener + gefärbter Standard. (Jeder Block und jeder Transfer sind mit einer eigenen einzigartigen Seriennummer gekennzeichnet)	Sensibilisierte Nitrocellulose. Gefärbtes Molekulargewicht (kDa): Blau: 250, Blau: 150, Blau: 100, Rosa: 75, Blau: 50, Grün: 37, Rosa: 25, Blau: 20, Blau: 15.
R2	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) mL PROBENPUFFER (Gebrauchsfertig – rosafarbene Lösung).	Puffer + Tensid.
R3	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 60</i>) mL ANTI-IgG-KONJUGAT (Gebrauchsfertig – blaue Lösung).	Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren.
R4	1	Fläschchen zu 30 (<i>30, 60</i>) mL ANTI-IgM KONJUGAT (Gebrauchsfertig - gelb Lösung).	Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera, konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (unter 0,1 %) + Stabilisatoren.
R5	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) mL SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen).	Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren.
R6	1	Fläschchen mit 60 (<i>60, 250</i>) mL WASCHKONZENTRAT 10X PUFFER (Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden – farblose Lösung).	Puffer + Tensid.

R1: Der Buchstabe vor jeder Streifennummer ist spezifisch für den Parameter.

R2, R3, R4, R5 und R6 sind Bestandteil aller Kits und weisen eine eigene einzigartige Chargennummer auf, die nur vom jeweiligen Produktionsdatum abhängt. **Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.**

R3, R4, (NaN₃): EUH 032 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

EUH 210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage sowie auf unserer Website www.ldbiodiagnostics.com erhältlich.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHES MATERIAL, DAS NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN IST

- Multikanal-Polypropylen-Inkubationswannen für Mini-Blots (#WBPP-08 oder gleichwertig).
- Wippschüttler für Immunoblots, Vakuumsystem für Flüssigkeiten (die von uns gelieferten #WBPP-08-Wannen können durch einfaches Umdrehen geleert werden).
- Röhrchen und Material zur Probenahme, Messzylinder, angepasste Behälter. Automatische Pipetten, Mikropipetten und Einwegspitzen (Mengen von 10 µl, 25µl, 1,2 mL und 2 mL).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser. Saugpapier (z. B. Whatman Filterpapier), transparentes Klebeband.
- Handschuhe, Pinzetten zur Handhabung der Streifen, Cutter oder Skalpell, flaches transparentes Lineal.

Hinweis: Unsere Reagenzien können in einem automatisierten Immunoblot-Prozessor verwendet werden. **Es sollte darauf geachtet werden, dass keine chemischen Kontaminationen unserer Reagenzien auftreten, wenn im Prozessor auch Reagenzien anderer Hersteller verwendet werden** (bekanntes Beispiel: Kontamination durch TWEEN 20), und keine bakteriellen Kontaminationen. Fläschchen für den Prozessor reservieren. Nach der Verarbeitung dürfen Reste verwendeter Reagenzien nicht zurück in die Originalfläschchen gegeben werden.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Zwischen 2 und 8 °C lagern. Die Reagenzien des Kits sind bis zum auf der Außenverpackung und den Fläschchenetiketten angegebenen Ablaufdatum stabil. Verwenden Sie kein kontaminiertes oder trübes Reagenz. 1/10 verdünnter Waschpuffer bleibt bei +2 bis +8 °C zwei Monate und bei Raumtemperatur eine Woche stabil.

WARNHINWEISE FÜR DEN GEBRAUCH

Sicherheit

- Nur für *In-vitro*-Anwendung. Nur für professionelle Anwendung. Nur für technisch geschultes Personal. Entsprechend der Guten Laborpraxis handhaben und jedes Reagenz und jede Probe als potenziell toxisch und/oder infektiös behandeln.
- Laborkittel, Handschuhe und Brille tragen; im Labor nicht trinken, essen oder rauchen. Pipetten nicht mit dem Mund handhaben.
- Das Substrat enthält eine Mischung aus NBT und BCIP und wirkt bei Kontakt (Haut und Schleimhäute) und Inhalation toxisch.
- Die Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei und Kupfer explosive Metallsalze bilden kann. Verschüttungen mit Wasser reinigen.
- Abfall (Proben, Spitzen, Röhrchen, Waschflüssigkeit, gebrauchtes Reagenz...) gemäß guter Praxis der Branche und aktuellen nationalen Bestimmungen entsorgen.
- Jeder schwerwiegende Zwischenfall muss dem Hersteller und der zuständigen Behörde gemeldet werden.

Vorsichtsmaßnahmen

- Lesen und interpretieren Sie die Ergebnisse unter direktem weißem Licht.
- Vorzugsweise sollten alle Reagenzien aus derselben Charge verwendet werden. Wenn unterschiedliche Chargen verwendet werden, muss die Rückverfolgbarkeit gewährleistet sein.
- Die Streifen in numerischer Reihenfolge verwenden. Streifen mit verschiedener Seriennummer nicht mischen; die Transfers der Reihe nach verwenden. Vor Testbeginn sollte ein spezifischer Aufteilungsplan erstellt werden.
- Die Streifen nicht mit den Fingern berühren; eine Pinzette verwenden.
- Die Reagenzien müssen vor der Verwendung gut vermischt werden, insbesondere der konzentrierte Waschpuffer.
- Die Fläschchen nach der Verwendung verschließen; nicht verwenden, wenn versehentlich eine Substanz in die Reagenzien gelangt ist. Reagenzien aus Fläschchen, die Anzeichen ausgelaufenen Materials aufweisen, nicht verwenden. Trübe oder ausgefällte Lösung nicht verwenden.
- Nur Einwegpipettenspitzen verwenden. Kontamination zwischen den Kanälen vermeiden. Darauf achten, ob sich in den Pipettenspitzen Schaum oder Bläschen bilden (bakterielle Kontamination der Reagenzfläschchen).

- Inkubationswannen nur mit klarem Wasser reinigen, gefolgt von destilliertem Wasser (niemals Detergenzien oder Bleichmittel verwenden).
- Das Auslassen einer Probe oder die Zugabe einer ungeeigneten Menge kann unabhängig vom tatsächlichen Status zu einem negativen oder positiven Testergebnis führen.

PROBENAHMEN

Die Proben aseptisch in trockenen Röhrchen sammeln. Es sind mindestens 35 µL Serum und 10 µL Kammerflüssigkeit erforderlich. Im Fall von Kammerflüssigkeit erhöht die Verwendung von 25 µL die Sensitivität des Tests (Siehe § Testverfahren).

Die Proben bis zur Verarbeitung bei 2-8 °C aufbewahren. Wenn sie länger als eine Woche gelagert werden sollen, die Proben bei -20 ± 5 °C einfrieren. Keine kontaminierten Proben verwenden. Die Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierten, ikterischen oder lipämischen Seren beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben mit Vorsicht zu interpretieren.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschpuffer: Für 4 Tests in einer sauberen Flasche müssen 10 mL Waschkonzentrat 10X (**R6**) in 90 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden. Achten Sie darauf, den verdünnten Puffer gut zu mischen.

TESTVERFAHREN

Anmerkung: Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

1. Den Aufteilungsplan der Proben erstellen.

Es ist zwingend erforderlich, den Vergleich an einem Probenpaar mithilfe aneinandergrenzender Streifen (fortlaufende Nummern), die aus demselben Transfer stammen (gleiche Seriennummer) durchzuführen. Der Vergleich von Streifen mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. **Es ist gefährlich** (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

2. Mit einem Skalpell und einem sauberen und trockenen, flachen, transparenten Lineal die erforderliche Anzahl Streifen (R1) zurechtschneiden, wobei die blaue Positionierungslinie auf den Streifen erhalten bleibt: die Streifen mit dem Lineal festhalten und auf der Seite mit dem Stamm schneiden (die Nummern sind durch das Lineal zu sehen).
3. 1,2 mL des Probenpuffers (R2) gemäß dem erstellten Plan in jeden Kanal verteilen.
4. Die nummerierten Streifen in numerischer Reihenfolge in den Kanälen platzieren: Lassen Sie die Streifen an der Oberfläche des Puffers etwa 2 Minuten rehydrieren, so dass die Markierung nach oben zeigt. Danach die Schale leicht schütteln, damit die Streifen vollständig in den Puffer einzutauchen.
5. Die Proben nach dem erstellten Aufteilungsplan (Schritt 1) und nach den unten angegebenen Mengen verteilen:

	Serum	Kammerflüssigkeit
IgG	10µL	10 oder 25µL
IgM	25µL	-

Im Fall von Kammerflüssigkeit erhöht die Verwendung von 25 µL die Sensitivität des Tests. Die Wanne nach jeder Dosierung leicht schütteln. Die Wanne auf einen Wippschüttler stellen. **Für 90 Minuten.** ± 5 Min. bei 20-26 °C inkubieren.

6. Waschschritt: Den Inhalt des Kanals mit einer Pasteurpipette oder durch Umdrehen der Inkubationswanne entleeren. 2 bis 3 mL verdünnten Waschpuffer in jeden Kanal geben. Auf dem Wippschüttler für 3 Minuten inkubieren. Zweimal wiederholen, dann den Inhalt der Kanäle entleeren. Sicherstellen, dass sich die Streifen während dieser Schritte nicht umdrehen.
7. Gemäß dem erstellten Aufteilungsplan 1,2 mL des Anti-IgG Konjugats (R3) oder 1,2 mL des Anti-IgM Konjugats (R4) jeweils in den entsprechenden Kanal geben. Die Wanne auf den Wippschüttler stellen. **Für 60 Minuten.** ± 5 Min. bei 20-26 °C inkubieren.
8. Waschschritt: Schritt 6 wiederholen.
9. 1,2 mL NBT/BCIP-Substrat (R5) in jeden der Kanäle geben. Auf den Wippschüttler stellen und vor direkter Lichteinstrahlung schützen. **Für 60 Minuten.** ± 5 Min. bei 20-26 °C inkubieren.

Unabhängig vom Parameter die Farbentwicklung überwachen. Die Entwicklung kann beendet werden, wenn die Hintergrundfarbe des Streifens so dunkel wird, dass Ablesen schwierig wird (die Qualität der Waschschritte hat einen grundlegenden Einfluss auf die Einfärbung des Hintergrunds). Es muss beachtet werden, dass die Streifen beim Trocknen heller werden.

- Es ist unerlässlich, die Entwicklung der 2 Streifen desselben Paares für dieselbe Antikörper-Unterkategorie zur selben Zeit zu beenden, doch die Untersuchung der IgG oder IgM kann unabhängig voneinander beendet werden. (Die IgM zeigen sich normalerweise langsamer als die IgG, da sie in schwächerer Konzentration vorhanden sind.)
- Die Konzentration von IgM im Serum eines Kindes ist normalerweise geringer. Die korrekte Entwicklung der Reaktion erfordert etwas mehr Geduld, und man sollte sich nicht dadurch verunsichern lassen, dass der mütterliche IgM Streifen etwas dunkler wird.
- Die Konzentration der Antikörper im Kammerwasser ist normalerweise geringer. Die korrekte Entwicklung der Reaktion erfordert etwas mehr Geduld, und man sollte sich nicht dadurch verunsichern lassen, dass die Serumstreifen etwas dunkler werden.

10. Die Reaktion wird durch Absaugen des Substrats mit einer Pasteurpipette oder Umdrehen der Inkubationswanne und Hinzufügen von 2 mL destillierten Wassers in die Kanäle gestoppt. Dieser letzte Waschschritt wird noch einmal wiederholt.
11. Trocknen der Streifen: Während die Kanäle noch mit Wasser gefüllt sind, werden die Streifen mit der Pinzette am nummerierten Ende herausgenommen und so, dass die Nummer sichtbar ist, auf Whatman Saugpapier gelegt. An der Luft trocknen lassen. Die Farbe der Streifen wird beim Trocknen natürlicherweise heller. Die Auswertung darf erst stattfinden, wenn die Trocknung abgeschlossen ist.
12. Lagerung: Übertragen Sie die Streifen auf das Blatt Papier, auf dem sie gelagert werden sollen. Richten Sie die blauen Positionslinien aus. Halten Sie dazu die Streifen mit dem Lineal fest und kleben Sie sie von oben mit dem transparenten Klebeband auf.

Die IgG und IgM Streifen jedes Probenpaares paarweise in aufsteigender numerischer Reihenfolge und gemäß dem erstellten Aufteilungsplan (Schritt 1) nebeneinander anordnen.

Es ist zwingend erforderlich, den Vergleich an einem Probenpaar mithilfe aneinandergrenzender Streifen (fortlaufende Nummern), die aus demselben Transfer stammen (gleiche Seriennummer) durchzuführen. Der Vergleich von Streifen mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. **Es ist gefährlich** (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

QUALITÄTSKONTROLLE UND -INTERPRETATION

Beschreibung der Banden

Eine positive Probe kann zahlreiche Banden zwischen 15 und 200 kDa aufweisen. Nur die Banden mit

einer Molekülmasse unter 120 kDa können zum Vergleich der Profile eingesetzt werden.

Auslegung

CIP WB G+M (Kongenitale Toxoplasmose)

- Bei der Geburt (Paare Mutter / Kind):

Die IgG und IgM Streifen unabhängig voneinander vergleichen.

Die 2 aneinandergrenzenden Streifen gleichzeitig von oben nach unten auswerten und dabei jedes im Nabelschnurblut **vorhandene und im mütterlichen Serum nicht vorhandene** Antigen-Band festhalten.

Jedes in gut definierter Auflösung erscheinende Band mit einer Molekülmasse (MG) unter 120 kDa, das *ausschließlich beim Kind vorhanden ist*, beweist die Bildung von Toxoplasmose-Antikörpern durch das Kind, was für eine kongenitale Toxoplasmose spricht.

- Bei der postnatalen Nachsorge (Paare Kind T0 / Kind T+N):

Die IgG und IgM Streifen unabhängig voneinander vergleichen.

Die 2 aneinandergrenzenden Streifen gleichzeitig von oben nach unten auswerten und dabei jedes im Serum T+N **vorhandene und im Nabelschnurblut nicht vorhandene** Antigen-Band festhalten.

Jedes in gut definierter Auflösung erscheinende Band mit einer Molekülmasse (MG) < 120 kDa, das *ausschließlich zum Zeitpunkt T+N vorhanden ist*, beweist die Bildung von Toxoplasmose-Antikörpern, was für eine kongenitale Toxoplasmose spricht.

Anmerkung: Die Indikation des CIP-WB IgG/IgM in der postnatalen Nachsorge wurde für den IgG-Nachweis bewusst auf 3 Monate und für den IgM-Nachweis auf 1 Monat beschränkt.

Anmerkungen: Die Gegenüberstellung des farbigen Standards der Molekülmassen (Hülle R1) ermöglicht die Schätzung des MG der ermittelten Antigen-Banden. (Er muss vorher mithilfe eines Lineals und eines Skalpellens wie ein gewöhnlicher Streifen zugeschnitten und mit einer Pinzette gehandhabt werden.)

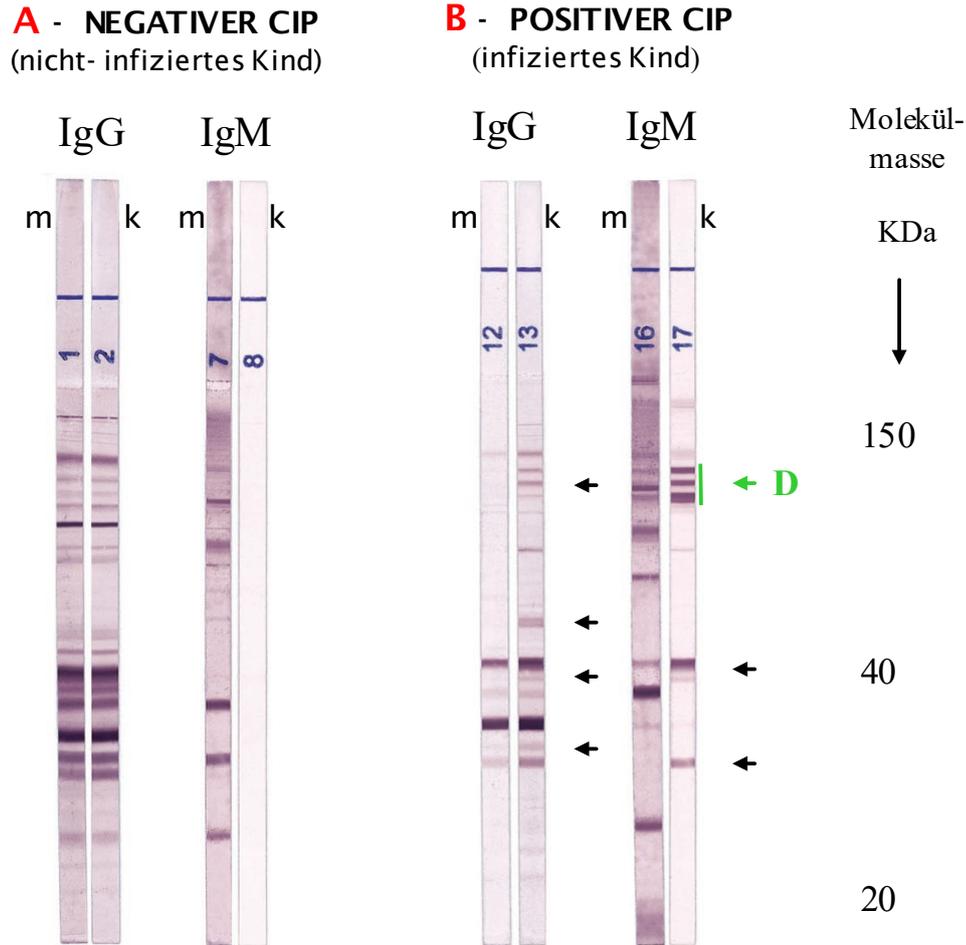


Abb. 1: Kongenitale Toxoplasmose Beispiele positiver und negativer Ergebnisse – (m=Mutter; k=Kind)

Die Profile sind als Beispiele angegeben. **Die Streifen sind mit dem Buchstaben "A" gekennzeichnet, der für den Parameter der Charge "00011" steht.**

Das Paar Mutter-Kind (A) entspricht einer während der Schwangerschaft infizierten Mutter, deren Kind gesund ist: Die IgG Profile sind vollkommen identisch (übertragene IgG). Das Kind weist auf den IgG und / oder IgM Streifen kein zusätzliches Band auf: **DER CIP-WB IST NEGATIV.**

Das Paar (B), kongenitale Toxoplasmose, entspricht einer während der Schwangerschaft infizierten Mutter, deren Kind ebenfalls infiziert ist. Außer den übertragenen Antikörpern erkennt man auf den Streifen des Kindes einwandfrei das Vorhandensein zusätzlicher IgG und oder IgM Banden (**←**), was den durch das Kind neu gebildeten Antikörpern entspricht: **DER CIP-WB IST POSITIV.**

Interpretation CIP WB IgG (Okuläre Toxoplasmose)

Die 2 zusammenhängenden Streifen gleichzeitig von oben nach unten auswerten und dabei jedes im Kammerwasser **vorhandene und im Serum nicht vorhandene** Antigen-Band festhalten.

Jede in gut definierter Auflösung erscheinende Bande mit einer Molekülmasse (MG) unter 120 kDa, das *ausschließlich im Kammerwasser vorhanden ist*, beweist die lokale Bildung von Toxoplasmose-Antikörpern, was für eine okuläre Toxoplasmose spricht.

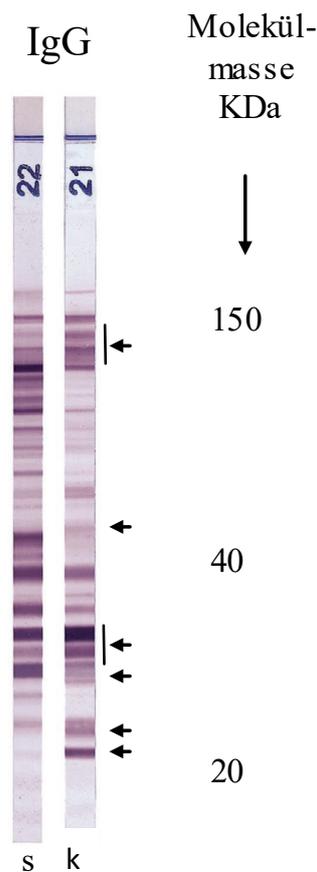


Abb. 2: Okuläre Toxoplasmose Beispiele positiver Ergebnisse – (s= Serum; k= kammerwasser)

Die Profile sind als Beispiele angegeben. **Die Streifen sind mit dem Buchstaben "A" gekennzeichnet, der für den Parameter der Charge "00011" steht.**

Sehr wichtige Hinweise

1. Um die Diagnose einer kongenitalen oder okulären Toxoplasmose erstellen zu können, müssen die übrigen klinischen, serologischen, parasitologischen, epidemiologischen Befunde sowie die Ergebnisse bildgebender Verfahren bei der Auswertung der Ergebnisse des CIP-WB IgG/IgM berücksichtigt werden.
2. Ein negatives CIP-WB IgG/IgM Ergebnis schließt die Diagnose einer kongenitalen oder okulären Toxoplasmose nicht aus. Es ist zwingend erforderlich, diese Patienten weiterhin zu beobachten, bis die Diagnose der Toxoplasmose endgültig bestätigt oder ausgeschlossen werden kann.
3. Das Aussehen der Banden kann sehr unterschiedlich sein: dünn, breit, mehr oder weniger farbig, intensiv... Bei der Aufnahme dieses Verfahrens wird empfohlen, einige Profil-Vergleiche an bekannten Probenpaaren durchzuführen, um sich mit der Auswertungsart vertraut zu machen. Außerdem wird empfohlen, zunächst zwei Personen im Labor unabhängig voneinander den CIP-WB auswerten zu lassen. Bei nicht übereinstimmender Auswertung muss ein Kontroll-CIP-WB durchgeführt werden.
4. Die Antigenfraktionen mit sehr hoher Molekülmasse (MG) erscheinen sehr eng konzentriert am oberen Ende des Streifens, damit die Fraktionen mit mittlerer und niedriger Molekülmasse in besserer Auflösung angezeigt werden können. Die Banden mit einem MG > 120 kDa sind deshalb für die Auswertung des Tests unbrauchbar: Die Proben, die ausschließlich solche Profilunterschiede aufweisen, können nicht als positiv eingestuft werden.
5. Im Gegensatz dazu wird auf den positiven CIP WB IgM Proben (bei kongenitaler Toxoplasmose) sehr häufig ein „dreifaches Band“ (drei sehr leicht erkennbare Banden) zwischen 75 und 100 kDa vorgefunden (vgl. „D“ **Abb. 1** Streifen Nr. 17 rechts).
6. Bei der Geburt (kongenitale Toxoplasmose) muss insbesondere jede allgemeine Verstärkung der Intensität der Banden (Hämokonzentration), die mit zusätzlichen Banden im Nabelschnurblut verwechselt werden können, kritisch betrachtet werden. Serumproben, die ausschließlich solche Profilunterschiede aufweisen, werden als

negativ eingestuft.

7. Im Gegensatz dazu wird (kongenitaler Toxoplasmose, okuläre Toxoplasmose) eine deutliche Verstärkung (häufig in der Breite oder in der Intensität) von einem oder zwei isolierten Banden, während alle anderen Banden die gleiche Intensität haben oder schwächer ausgeprägt sind, als Kriterium eines positiven Ergebnisses betrachtet.
8. Natürliche Antikörper (kongenitale Toxoplasmose):
Das Immunoblot-Assay Verfahren ist besonders sensibel und das für den CIP WB Test eingesetzte Antigen wurde ausgewählt, weil es das Erscheinen einer Vielzahl von Banden auf den Streifen bewirkt.
Zahlreiche Publikationen befassen sich mit Banden, die mittels Immunoblot-Assay bei Menschen festgestellt wurden, bei denen nie ein Verdacht auf Toxoplasmose bestanden hat. Diese Antikörper (IgG und IgM) werden durch die anderen Verfahren nur selten festgestellt, durch Immunoblot-Assay aber sehr häufig. Ein Grund dafür könnten Kreuzreaktionen mit Antikörpern sein, die sich gegen noch nicht bestimmte natürliche Immunogene richten.
Aus diesem Grund ist die Indikation des Tests **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** dem Profil-Vergleich vorbehalten. (Zur Bestätigung der serologischen IgG-Befunde nur den **LDBIO TOXO II IgG** Test verwenden, der für diesen Zweck vorgesehen und spezifisch ist.)
Neugeborene weisen keine natürlichen Antikörper auf (abgesehen von den übertragenen mütterlichen Antikörpern), aber die Wahrscheinlichkeit des Auftretens natürlicher Antikörper steigt mit zunehmendem Alter des Säuglings ab dem 3. Lebensmonat, doch werden sie im Alter zwischen 3 und 6 Monaten nur selten vorgefunden.
Aus diesem Grund wurde die Indikation des CIP-WB IgG/IgM in der postnatalen Nachsorge bewusst auf 3 Monate für IgG und auf 1 Monat für IgM begrenzt: Das Auftreten unspezifischer Banden erfolgt bei den IgM-Antikörpern tatsächlich frühzeitiger.
9. "Heat Shock Protein" (kongenitale Toxoplasmose):
Ein unspezifisches dünnes Band von schwacher, aber veränderlicher Intensität kann bei IgM-Antikörpern im Bereich von 37 kDa auftreten. Es handelt sich hierbei um ein Artefakt in Verbindung mit der Vorbereitung des Antigens, das als „Heat Shock Protein“ bezeichnet wird. Auch wenn es auf beiden Streifen des Paares Mutter-Kind zugleich auftritt, kann es bei manchen Serumproben im Rahmen der Untersuchung des Kindes gelegentlich ausgeprägter sein. Dieses Band nicht berücksichtigen.
10. CIP WB (Okuläre Toxoplasmose): Der CIP-WB IgM Test ist nicht für die Diagnose der okulären Toxoplasmose einsetzbar. Der CIP-IgA ist jedoch von diagnostischem Interesse. Für weitere Informationen zu CIP-IgA kontaktieren Sie uns bitte.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Die Diagnose einer Infektionskrankheit kann nicht anhand eines einzelnen Testergebnisses gestellt werden.
- Serologische Ergebnisse müssen gemäß den verfügbaren Informationen (z. B. Epidemiologie, Klinik, Bildgebung, Biologie ...) interpretiert werden, um eine Diagnose zu erstellen. Sie sollten nicht allein aufgrund ihrer Positivität als Grundlage für die Diagnose verwendet werden.

LEISTUNG (siehe Literaturhinweise, S.12)

Diese Studien wurden von unabhängigen Referenzlaboren durchgeführt.

CIP-WB G+M: KONGENITALE TOXOPLASMOSE bei der Geburt (Mutter / Kind)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
KLINISCHE DATEN	KT POS n=54	41	13
	KT NEG n=60	0	60

Tabelle. 1: Leistungsfähigkeit des CIP-WB IgG/IgM Tests bei der Geburt (n=114):

Spezifität = 100 %

Positiver prädiktiver Wert = 100 %

Sensitivität = 76 %

Negativer prädiktiver Wert = 83 %

CIP-WB G+M: KONGENITALE TOXOPLASMOSE in der postnatalen Nachsorge (Kind T0/ T20)

Von den 54 zuvor zum Zeitpunkt T0 getesteten Kindern (**Tabelle. 1**) wurden 10 gesunde Kinder und 12 infizierte Kinder (n=22) zum Zeitpunkt T20 erneut untersucht, und eine retrospektive Analyse mit dem Test **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** wurde durchgeführt.

- **Zeitpunkt T0:** 4 von 12 infizierten Kindern wiesen bei der Geburt kein abweichendes Profil auf (falsch negatives Ergebnis).
- **Zeitpunkt T20:** 1 einziges bleibt negativ.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
KLINISCHE DATEN	KT POS n=12	11	1
	KT NEG n=10	0	10

Tabelle 2: Leistungsfähigkeit des CIP-WB IgG/IgM zum Zeitpunkt T20 (n = 22):

Spezifität = 100 %

Positiver prädiktiver Wert = 100 %

Sensitivität = 92 %

Negativer prädiktiver Wert = 91 %

CIP WB IgG: OKULÄRER TOXOPLASMOSE (Serum / Kammerwasser)

Die unten angeführten Leistungen stammen aus der Metaanalyse von vier Studien, die von Referenzzentren veröffentlicht wurden.

Diese Studien vergleichen die Leistungen des CIP-WB **IgG** mit jenen des Goldmann-Witmer-Koeffizienten (GWK) und der PCR. Sie zeigen auch die diagnostischen Leistungen, die mithilfe der Kombination aus zwei oder drei dieser Methoden erzielt werden können.

Alle vier Studien verwendeten den LDBIO-Test in Übereinstimmung mit den Empfehlungen aus der dem Kit beigelegten Gebrauchsanweisung.

Bei 113 Patienten, die eine klinisch nachgewiesene das Auge betreffende Toxoplasmose zeigten, wurde die Sensitivität untersucht. Die Spezifität wurde in einer Kontrollpopulation berechnet, die eine andere Augenerkrankung als Toxoplasmoseinfektion aufwies: das Auge betreffende Toxocariasis (n=5), Virusinfektion (n=10), andere Infektionen (n=4), nicht-infektiöse Augenerkrankungen (n=126), darunter Katarakt (n=42).

Sensitivität (Se)

Die allgemeine Sensitivität des CIP-WB IgG liegt bei **62,8 %** (n=113), eine Leistung, die mit dem GWK (Se=61,0 %, n=113) vergleichbar ist und über jener der PCR (Se=43,5 %, n=92, p=0,0028) liegt.

Die Kombination des CIP-WB mit dem GWK und der PCR verbessert die Sensitivität der Diagnose.

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

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

Spezifität (Sp)

Die allgemeine Spezifität des CIP-WB IgG liegt bei **92,8 %** (n=111), eine Leistung, die mit dem GWK (Sp=94,2 %, n=139) vergleichbar ist und unter jener der PCR (Sp=100 %, n=131, p=0,0009) liegt.

Die Kombination der beiden Methoden, CIP-WB IgG + GWK, verringert die Spezifität der Diagnose leicht (Sp=91,1 %, n=101, p=0,32). Die Kombination mit der PCR hat keinen Einfluss auf die Spezifität.

Fazit

Der **Toxoplasma WB IgG IgM**-Immunoassay weist eine hervorragende Leistung bei der Diagnose einer angeborenen oder okulären Toxoplasmose auf.

Bei angeborener Toxoplasmose hat das CIP-WB G + M eine Sensitivität von **76%** [95CI 62-86%] und eine Spezifität von **100%** [95CI 92-100%] bei der Geburt. Ein erneuter Test im ersten Lebensmonat erhöht die Empfindlichkeit des CIP-WB G + M weiter.

Bei der Augentoxoplasmose hat CIP-WB-IgG eine Sensitivität von **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] und eine Spezifität von **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Die Kombination mit anderen Techniken (GWC und / oder PCR) erhöht die diagnostische Leistung.

Reproduzierbarkeit

Es wurde die Reproduzierbarkeit zwischen Serien und Chargen geprüft. In beiden Fällen ist die Korrelation hinsichtlich der spezifischen Banden zwischen Sera sehr gut.

Beeinträchtigung

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierend, ikterischen oder lipidischen Sera beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben aufmerksam zu beobachten.

FEHLERBEHEBUNG

„Die Banden sind blass und weisen kaum Kontrast auf“: Bestimmte Sera mit niedrigen Konzentrationen von Antikörpern können solche Ergebnisse zeigen.

„Es sind schattierte Bereiche sichtbar, mehr oder weniger farbig, leicht diffus“: Der Streifen wurde in eins der Reagenzien nicht vollständig eingetaucht und wurde nicht über seine gesamte Länge korrekt inkubiert. Es können auch Flecken an den Stellen vorhanden sein, an denen die Probe platziert wurde, wenn die Wanne anschließend nicht geschüttelt wurde.

„Der Hintergrund ist dominant, wodurch das Ablesen sehr schwer wird“: Die Waschungen waren unzureichend oder die letzte Inkubation zu lang. Gute Techniken zur Testleistung sicherstellen, die Waschzeiten einhalten und die Wasserqualität sicherstellen. Die Zeit der letzten Inkubation reduzieren. In Ausnahmefällen können bestimmte Sera unspezifisch reagieren. Dann ist das Ergebnis des Immunoblots unbrauchbar.

Dieser unspezifische, dominante Hintergrund kann nur einen Teil des Streifens betreffen und somit können nur hier die Ergebnisse nicht ausgewertet werden.

„Während des letzten Entwicklungsschritts erscheint eine Ausfällung in der Lösung“: das Substrat kann tatsächlich zum Ende der Entwicklung im Puffer teilweise ausfallen (schwarze Flocken). Dieses Phänomen verändert die Qualität der Entwicklung nicht, die normal fortgesetzt werden sollte. Die letzte Waschung mit destilliertem Wasser entfernt möglicherweise vorhandene feste Partikel.

Literaturverzeichnis

- 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-BENACHRICHTIGUNG - bitte sorgfältig lesen

VERÖFFENTLICHUNGSDATUM	VERSION	SÄNDERUNGS-ZUSAMMENFASSUNG
26/07/2021	Vs18	Beseitigung der Sicherheitswarnung R5 - Kontakt-E-Mail-Adresse – NaN3 EUH 032
25/07/2022	Vs19	R6 ohne NaN3. Streifen mit Buchstabe A gekennzeichnet. Möglicherweise Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.
02/10/2022	Vs20	Neue Adresse



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