

**TOXOPLASMA** CE0459



**Western Blot IgG IgM**

*In vitro* diagnosztika Immunoblot vizsgálat  
Félautomatizált / manuális technika

#TOP-WB24GM: 24 tests

#TOP-WB12GM: 12 tests

#TOP-WB96GM: 96 tests

## HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

További információt és használati utasítást az Ön nyelvén a  
[www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## RENDELTETÉSSZERŰ HASZNALAT

A **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** egyszer használatos immunoblot módszer az immunológiai profilok (CIP-WB) összehasonlítására az IgG és az IgM diagnosztizálása során:

- Kongenitális toxoplazmózis születéskor (D0): CIP-WB G+M az anyai vér és a köldök vér között.
- Kongenitális toxoplazmózis születés utáni monitorozásban (D+N): CIP-WB G+M a nulladik napi (D0) köldökzsinór vér és a gyermek n-edik napi (D+N) vérmintája között.
- A szem toxoplazmózisa: CIP-WB IgG a beteg savó és a csarnokvíz között.

Ez a módszer nem szűrésre vagy a szerológia megerősítésére szolgál. Ennek alkalmazására használja az **LDBIO TOXO II IgG** vizsgálatot (lásd TOXO II IgG WB).

## A VIZSGALAT ELVE

### Western Blot technika

A *Toxoplasma gondii* antigénjeit elektroforézis segítségével elkülönítik úgy, hogy az elektroblottolás során a 24 részre vágható (1-24-ig elnevezett) nitrocellulóz membrán (más néven transzfer) felszínéhez kötődik.

### A vizsgálat lefolytatása

*Megjegyzés:* Az alábbiakban leírt IgG és IgM immunoblot módszert egyidejűleg kell elvégezni a vizsgálati beállítás alatt.

### IgG immunoblot

A vizsgálat során külön kell inkubálni, **ugyanabból a transzferből származó 2 egymás melletti tesztcsík** segítségével a két típusú mintát (szérum vagy csarnokvíz) az immunológiai profiljuk összehasonlítása érdekében.

- 1 lépés: Minden egyes szérum (vagy csarnokvíz) beteganyagot külön inkubálva egy tesztcsík segítségével kell vizsgálni. A mintában potenciálisan jelenlévő anti-Toxoplasma ellenanyag szelektív kapcsolódik a *T. gondii* antigénhez.
- 2 lépés: Az alkalikus-foszfátáz **anti-humán IgG** konjugátum, majd kapcsolódik a kikötődött anti-antitestekhez.
- 2 lépés: Az immunkomplexek reakcióba lépnek a szubsztráttal. A mintákban jelenlévő **IgG osztályú** anti-*Toxoplasma* ellenanyagok által felismert antigének lila transzverzális sávként jelennek meg.

### IgM immunoblot

A módszer elve azonos, de a második lépésben a fent említett konjugátum helyett egy alkalikus-foszfátáz **anti-humán IgM** konjugátum kötődik ki. A mintákban jelenlévő **IgM osztályba** tartozó anti-*Toxoplasma* ellenanyag által felismert antigének az antigén sávban színfejlődést eredményez.

### Leolvasás

Az IgG tesztcsík párok, majd az IgM (vagy IgA) tesztcsík párok összehasonlítása megmutatja azon sávok potenciális jelenlétét, amelyek csak az egyik mintában van jelen és a másikban nem (lásd Kiértékelés fejezetet).

## REAGENSEK BIZTOSÍTOTTAK

Alapértelmezés: 24 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TOP-WB24GM)

dőlt: 12 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TOP-WB12GM) - **Félkövér: 96 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TOP-WB96GM)**

Azonosító	Mennyiség	Leírás	Összetétel
R1	1	24 TESZTCSÍKOT tartalmazó csomag (12, <b>4x24</b> ): előre bemetszett és színes standardokkal (Mindegyik csomag és mindegyik transzfer egyedi gyártási számmal ellátott)	Érzékenyített nitrocellulóz. Színes Molekuláris súlymarkerek (kDa): Kék: 250, Kék: 150, Kék: 100, Rózsaszín: 75, Kék: 50, Zöld: 37, Rózsaszín: 25, Kék: 20, Kék: 15.
R2	1	30ml-es (30, <b>125</b> ) MINTA PUFFER (Használatra kész – rózsaszín oldat).	Puffer + felületaktív anyag.
R3	1	30ml-es (30, <b>60</b> ) ANTI IgG KONJUGÁTUM (Használatra kész – kék oldat).	Puffer + anti-humán IgG poliklonális kecske szérum alkalikus-foszfátázzal konjugáltatva + NaN3 (<0.1%) + stabilizátorok
R4	1	30ml-es (30, <b>60</b> ) ANTI-IgM KONJUGÁTUM (Használatra kész – sárga oldat).	Puffer + anti-humán IgM poliklonális kecske szérum alkalikus-foszfátázzal konjugáltatva + NaN3 (<0.1%) + stabilizátorok
R5	1	30ml-es (30, <b>125</b> ) SZUBSZTRÁT (Használatra kész – barna oldat).	Puffer + NBT + BCIP + stabilizátorok
R6	1	60ml-es (60, <b>250</b> ) <i>MOSÓ KONCENTRÁTUM</i> 10X PUFFER (Desztillált vízben 10-szeresre kell hígítani – színtelen oldat).	Puffer + felületaktív anyag.

**R1:** Az egyes szalagszámok előtti betű a paraméterre jellemző.

**Az R2, R3, R4, R5 és R6** azonosítójú reagensek az összes kithoz általánosak és egyedi gyártási számmal ellátottak, mely csak a gyártási időpontjuktól függ. **Ajánlott többparaméteres vizsgálatot végezni (lásd az LDBIO immunoblot tartományt) a kinyitott ampullák számának korlátozása és a jobb minőség-ellenőrzés biztosítása érdekében.**

R3, R4 (NaN<sub>3</sub>): EUH 032 - Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek.

EUH 210 Kérésre biztonsági adatlap kapható valamint a [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com) weboldalon.

## A KIT ÁLTAL NEM BIZTOSÍTOTT, DE SZÜKSEGES REAGENSEK ÉS ANYAGOK

- Többcsatornás polipropilén inkubációs tálcák a mini-blottokhoz (#WBPP-08 vagy ezzel megegyező).
- Keverő/rázató laboratóriumi eszköz az immunoblottokhoz, a folyadékokhoz szükséges vákurendszer (#WBPP-08 csövek, melyek egyszerűen elforgatással üríthetőek).
- A mintákhoz szükséges csövek és további műanyagáruk, szakszerű cilinderek, és felfogó tartályok. Automatikus pipetták, mikropipetták és eldobható, egyszer használatos hegyek (10µl, 25µl, 1.2 ml és 2 ml térfogatúak).
- Desztillált vagy ionmentesített víz. Abszorbens papír (például Whatman szűrőlapok), átlátszó ragasztószalag.
- Kesztyű, csipeszek a tesztcsíkok kezeléséhez, vágóeszköz vagy szike, lapos átlátszó vonalzó.

**Megjegyzés:** A reagenseink automatizált immunoblot processzorokban használhatóak. **Amennyiben másik gyártó reagenseivel működtetik a processzort, úgy figyeljen az ebből adódó lehetséges kémiai kontamináció (ismert példa: TWEEN 20 oldattal történő szennyezés) és bakteriális kontamináció elkerülésére.** Tartsa az injekciós üvegeket a proceszorhoz. A vizsgálati folyamatot követően, ne tegye vissza a felhasznált reagenseket az eredeti injekciós üvegbe.

## TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

2-8°C között tárolandó. A kitben lévő reagensek a külső dobozon és a csöveken feltüntetett lejárati ideig stabilak. Ne használjon szennyezett vagy zavaros reagenseket. A mosó puffer 1/10-es hígítása 2 hónapig stabil +2 és +8°C közötti hőmérsékleten és egy hétig szobahőmérsékleten.

## ÓVINTÉZKEDESEK

### Biztonság

- Kizárólag *in vitro* diagnosztikai célú felhasználásra. Csak professzionális használatra. Csak műszakilag képzett személyzet számára. Kezelje a Jó Laboratóriumi Gyakorlatnak (GLP) megfelelően és tekintse a reagenseket és bármely mintát potenciálisan fertőzőnek és/vagy toxikusnak.
- Viseljen laboratóriumi köpenyt, gumikesztyűt és védőszemüveget; ne egyen, ne igyon és ne dohányozzon a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal.
- NBT és BCIP keveréket tartalmaz a szubsztrát, bőrrel való és nyálkahártyán keresztüli érintkezés, valamint belégzés során toxikus.
- A reagensek nátrium-azidot tartalmaznak, mely ólommal és rézzel robbanékony fémsókat képezhetnek. A kiömlött anyagot öblítse le vízzel.
- A kidobandó hulladékot (minták, pipettahegyek, csövek, mosófolyadék, felhasznált reagensek...) a munkahelyi szabályozásoknak és az országban érvényes előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa.
- Minden súlyos eseményről nyilatkozatot kell benyújtani a gyártónak és az illetékes hatóságnak.

### Óvintézkedések

- Olvassa el és értelmezze az eredményeket közvetlen fehér fény alatt.
- Célszerű az összes reagenseket ugyanabból a tételből használni. Különböző tételek használata esetén biztosítani kell a nyomon követhetőséget.
- Használja a tesztcsíkokat a számozott sorrendben. Ne keverje a különböző gyártási számú tesztcsíkokat, használja a transzfereket egymás után. A vizsgálat előtt hozzon létre egy speciális beállítási munkatervet.
- Ne érjen a tesztcsíkokhoz az ujjával, használjon csipeszt a kezelésükhöz.
- A reagenseket használatuk előtt alaposan össze kell keverni, különösen a koncentrált mosópuffert.
- Használat után zárja be a flaskákat, ne használja, ha egy anyag véletlenül bekerült a reagensbe. Ne használjon reagenst olyan injekciós flaskából, amely a szívárgás jeleit mutatja. Ne használja a zavaros vagy kicsapódott oldatot.
- Használjon kizárólag eldobható, egyszer használatos pipettahegyeket. Kerülje a csatornák közötti kontaminációt. Ügyeljen arra, hogy ne keletkezzen a pipettahegyek végeiben hab vagy buborék (a reagens flaskák bakteriális kontaminációja).
- Az ikbuációs tálcákat csak desztillált vízzel tisztítsa (soha ne használjon detergenset vagy hipót).
- A minta kihagyása vagy a minta nem megfelelő térfogata negatívvá vagy pozitívvá teheti a vizsgálat eredményét, függetlenül annak tényleges állapotától.

## MINTAVETEL

Aszeptikus körülmények között a mintákat száraz csövekbe gyűjtjük. Legalább 35µl szérum vagy 10µl csarnokvíz szükséges. A csarnokvíz esetében, ha 25µl-t használ fel, akkor emelheti a vizsgálat érzékenységét (Lásd a § VIZSGÁLATI ELJÁRÁS)

Tartsa a mintákat feldolgozásukig 2-8°C közötti hőmérsékleten. Ha szükséges a minták tárolása több mint egy héten at, akkor fagyassza a mintákat -20 ± 5°-os hőmérsékleten Ne használja a kontaminálódott mintákat. Kerülje a minták ismétlődő olvasztását-fagyasztását.

Habar a hemolizált, ikerikus vagy lipides szérumok esetében nem tapasztaltunk különös keresztreakciót, ajánlatos az ilyen minták feldolgozásakor a kapott eredményeket körültekintően értelmezni.

## REAGENSEK ELOKESZITÉSE

**Mosó puffer:** 4 vizsgálatra elegendő mennyiséghez egy tiszta csőben higítsa meg a 10X Mosó Koncentrátumot (R6) úgy, hogy 10ml-jét 90ml desztillált vagy ionmentes vízhez adja. Óvatosan keverje össze a hígított puffert.

## VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

*Nota Bene:* Ajánlott többparaméteres vizsgálatot végezni (lásd az LDBIO immunoblot tartományt) a kinyitott ampullák számának korlátozása és a jobb minőség-ellenőrzés biztosítása érdekében.

1. Készítse el a minták beállítási tervét.

**Szigorúan kötelező a mintapárok összehasonlítása egy adott transzferből származó (azonos gyártási számú) összekapcsolt tesztsíkok (egymás melletti számokkal) segítségével.** Az egymástól távol eső tesztsíkok összehasonlítása nem megbízható a kiértékelés során (például 2. a 15. tesztsíkhöz képest). **Nagyon kerülendő** (fals eredményt eredményez) azon tesztsíkok használata, melyek különböző kitekéből (tesztsíkok eltérő gyártási számúak) származnak.

2. Vágja le a szükséges számú tesztsíkot (R1) szike és tiszta és száraz, lapos átlátszó vonalzó segítségével, a kék pozícionáló vonalakat hagyja meg a tesztsíkokon. A tesztsíkokra nyomja rá szorosan a vonalzót és vágja le a tesztsík oldala mentét a csíkokat (a számok a vonalzón keresztül láthatóak).
3. Az elkészített beállítási tervnek megfelelően a mintatartó tálca egyes csatornáiba osszon el 1,2 ml minta puffert (R2).
4. A számozási sorrendnek megfelelően helyezze el a tesztsíkokat a mintatartó tálca csatornáiba úgy, hogy a tesztsíkok tetején látható számok felfelé álljanak: Hagyja, hogy a tesztsíkok felülete körülbelül 2 percig rehidratálódjon a minta pufferben, majd óvatosan ütögessen meg a tálcat, hogy teljesen elmerüljenek a pufferben.
5. Ossa ki a mintákat a megállapított beállítási terv szerint (1. lépés) és a következő mennyiségekkel:

	Szérum	Csarnokvíz
IgG	10µl	10 or 25µl
IgM	25µl	-

A csarnokvíz esetében, ha 25µl-t használ fel, akkor emelheti a vizsgálat érzékenységét. Minden bemérésnél alaposan ütögesse meg a tálcat. Az utolsó bemérést követően a tesztsík tároló tálcat helyezze egy keverő/rázató berendezésre. Majd rázatva **inkubálja 90±5 percig, 20-26°C közötti hőmérsékleten.**

6. Mosási lépés: Ürítse ki a csatornák tartalmát vagy Pasteur pipetta segítségével vagy pedig az inkubációs tálca felfordításával. A tálca egyes csatornáiba 2-3ml hígított mosópuffert pipettázzon. Inkubálja a keverő/rázató eszközön a tesztsíkokat 3 percig. Ismétlje meg az előző folyamatot kétszer, majd ürítse ki a csatornák tartalmait. Bizonyosodjon meg affelől, hogy a tesztsíkok nem fordultak meg ezen lépések alatt.
7. A kialakított beállítási/bemérési munkaterv alapján adjon 1,2ml anti-IgG konjugátumot (R3) vagy 1,2ml anit-IgM konjugátumot (R4) minden egyes csatornába. Helyezze a tálcat a keverő/rázató eszközre. **Inkubálja 60±5 percig, 20-26°C közötti hőmérsékleten.**
8. Mosási lépés: Ismétlje meg a 6. lépést.
9. Adjon 1,2 ml NBT/BCIP szubsztrát keveréket (R5) minden egyes csatornához. Helyezze a tálcat a keverő/rázató eszközre és most már védje meg a tesztsíkokat a közvetlen napfénytől. Majd így **inkubálja 60±5 percig, 20-26°C közötti hőmérsékleten a csíkokat.**

Az inkubációs paramétertől függetlenül folyamatosan figyelje a szín fejlődését. A színfejlődés leállítható, ha a tesztcsík háttérszíne sötétebbé válik, ami megnehezíti a leolvasást (a mosási lépések minősége alapvetően befolyásolja a háttérszint). Ne feledje, hogy a tesztcsíkok kivilágosodnak, ha megszáradtak.

- Elengedhetetlen a színfejlődés azonos időben történő leállítása mintapárok esetében, két különböző tesztcsík használatakor ugyanazon ellenanyag alosztály vizsgálatakor, de függetlenül leállíthatók az IgG-k és IgM-ek (az IgM alacsonyabb koncentrációban, általában sokkal lassabban jelennek meg, mint az IgG-k).
- A gyermekek savója rendszerint az IgM-et alacsonyabb koncentrációban tartalmazza. A reakciónak elegendő időt kell biztosítani ahhoz, hogy megfelelően megtörténejn a szín fejlődése, és nem szabad aggódnia az anyai IgM tesztcsíkon látható sáv egy kicsit sötétebbé válik.
- A csarnokvízre rendszerint alacsonyabb ellenanyag koncentráció jellemző. A reakciónak elegendő időt kell biztosítani ahhoz, hogy megfelelően megtörténejn a szín fejlődése, és nem szabad aggódnia, ha a szérumban tesztcsíkon látható sáv egy kicsit sötétebbé válik.

10. Állítsa le a reakciót a szubsztrát vagy Pasteur pipettával történő leszívásával vagy az inkubációs kád felfordításával, majd 2ml desztillált vizet adjon minden egyes csatornába. Ismétlje meg ezt az utolsó mosási lépést még egyszer.
11. Tesztcsíkok megszáradtása: A még vízzel telített csatornákból vegye ki csipesz segítségével a tesztcsíkokat, majd jól látható módon, a számozott végükkel helyezze el Whatman abszorbens szűrőpapírra. Hagyja megszáradni a tesztcsíkokat a levegőn.
12. Tárolás: Tegye át a megszáradt tesztcsíkokat egy papírlapra, amit az archiváláshoz fog használni. Pontosan rendezze a tesztcsíkokat a pozícionáló vonal mentén. Tartsa ebben a helyzetben, egy lapos vonalzó segítségével, majd a tesztcsíkok felső részént átlátszó ragasztóval rögzítse az archiváló papírhoz.

Párosítsa, egymás mellé, az IgG és IgM tesztcsík mintapárokat a növekvő számsor szerint, a meghatározott beállítási munkaterv figyelembevételével (1. lépés).

**Szigorúan kötelező a mintapárok összehasonlítása egy adott transzferből származó (azonos gyártási számú) összekapcsolt tesztcsíkok (egymás melletti számokkal) segítségével.** . Az egymástól távol eső tesztcsíkok összehasonlítása nem megbízható a kiértékelés során (például 2. a 15. tesztcsíkhöz képest). **Nagyon kerülendő** (fals eredményt eredményez) azon tesztcsíkok összehasonlítása, melyek különböző kitekiből (tesztcsíkok eltérő gyártási számúak) származnak.

## MINŐSÉGI ELLENŐRZÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

### A sávok jellemzése

A pozitív minta, jelentős számú sávot jeleníthet meg 15 és 200 kDa között. Csak a 120 kDa-nál kisebb molekulatömegű sávok használhatók a profilok összehasonlítására.

### Értelmezés

#### CIP WB G+M (kongenitális toxoplazmózis)

- Születéskor (anya/gyermek pár):

Az IgG sávok és az IgM sávok függetlenül összehasonlíthatóak. Olvassa le az egymás melletti tesztcsíkot egyazon időben a tesztcsík tetejétől az aljáig, miközben megkeres minden olyan antigén sávot, amely a köldökzsinór vérben **meztalálható**, **de** az anyai szérumban **nem**.

Bármely olyan sáv, amely jól elkülönült felbontással rendelkezik a 120 kDa-nál kisebb molekulatömegű és *csak a gyermek vérében van jelen*, bizonyítja azt, hogy a gyermekben jöttek létre az anti-toxoplazma ellenanyagok, utalva a kongenitális toxoplazmózisra.

- A születés utáni monitorozás alatt (gyermek D0 / gyermek D+N párok):

Az IgG sávok és az IgM sávok függetlenül összehasonlíthatóak.

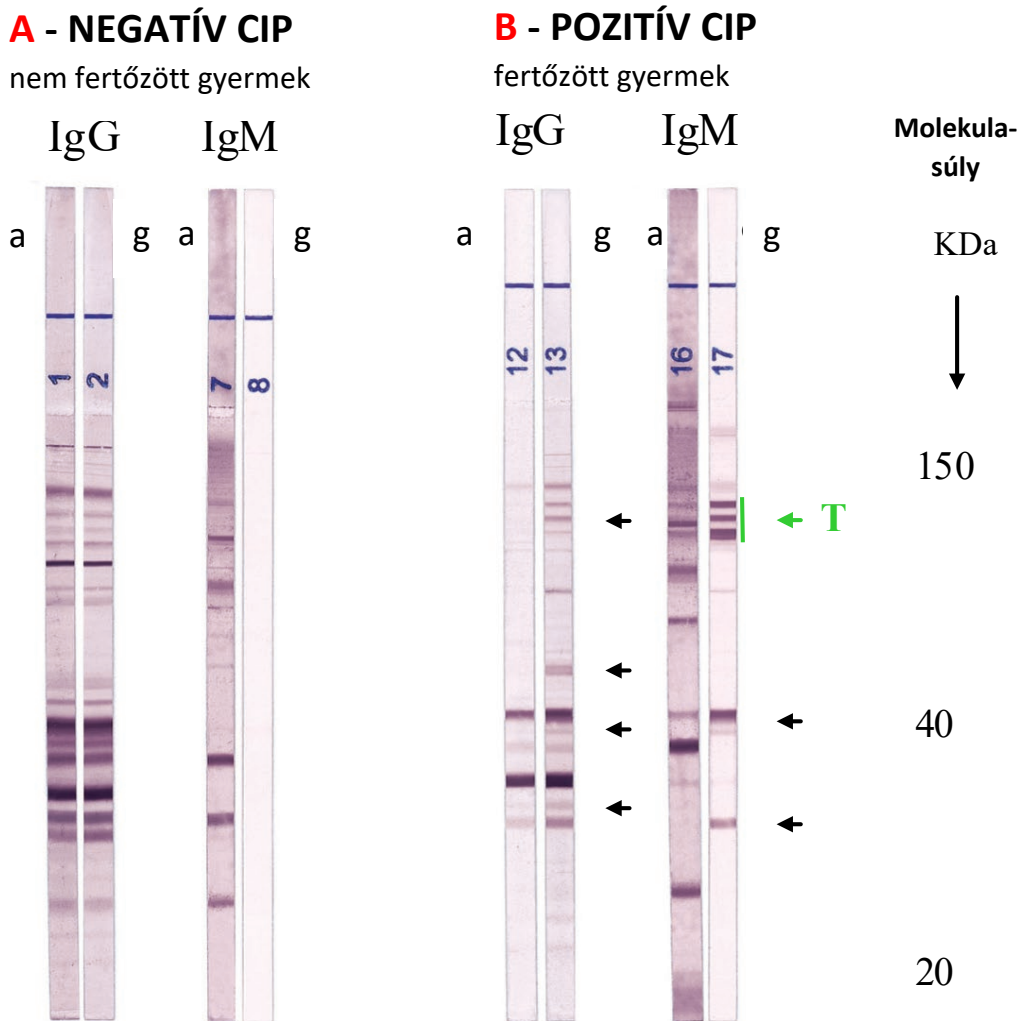
Olvassa le az egymás melletti tesztcsíkot egyazon időben a tesztcsík tetejétől az aljáig, miközben megkeres minden olyan

antigén sávot, amely a D+N napi szérumban **meztalálható**, **de** a köldökzsinór vérben **nem**.

Bármely olyan sáv, amely jól elkülönült felbontással rendelkezik a 120 kDa-nál kisebb molekulatömegű és *csak a D+N napi savóban van jelen*, bizonyítja azt, hogy a gyermekben jöttek létre az anti-toxoplazma ellenanyagok, utalva a kongenitális toxoplazmózisra.

*Megjegyzés:* a CIP-WB IgG/IgM indikációja a születés utáni monitorozás során szándékosan korlátozódik az IgG esetében 3 hónapra, míg az IgM esetében 1 hónapra.

*Megjegyzés:* A megfestődött molekula-súly standard (R1) egymás melletti elhelyezése lehetővé teszi a kifejlődött antigénsávok molekula-súlyának becslését.



1. **ábra.** Kongenitális toxoplazmózis – Példa a pozitív és negatív eredményekre (Jelzések: a – anya; g – gyermek)  
A profilok példaként szerepelnek. A csíkokat az "00011" tételből származó paraméterre jellemző "A" betűvel jelöltük.

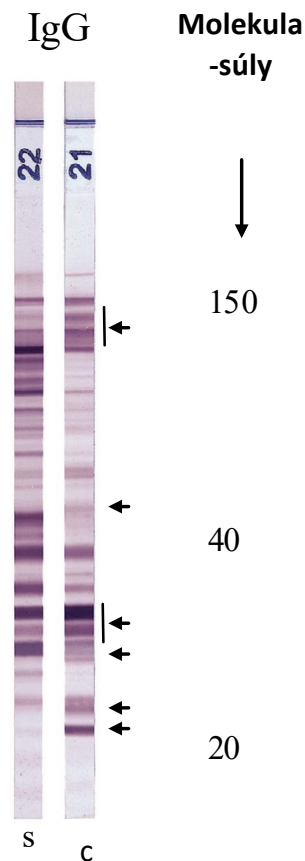
Az **anya-gyermek pár (A)** a terhesség alatt fertőzött anyával van összhangban, de gyermeke nem fertőződött meg: Az IgG profilok szigorúan véve azonosak (átadott IgG), nincs más további sáv jelen a gyermek IgG és/vagy IgM tesztcsíkján: **A CIP-WB NEGATÍV.**

Az **anya-gyermek pár (B)**, kongenitális toxoplazmózis, a terhesség alatt fertőzött anyával van összhangban, akinek a gyermeke is megfertőződött: Az átadott antitestek miatt, a gyermek IgG és/vagy IgM tesztcsíkokon további sávok (←) jelennek meg tökéletesen kivethető formában, melyek megfelelnek a gyermek által újonnan szintetizált antitesteknek: **A CIP-WB POZITÍV.**

## CIP WB IgG (okuláris toxoplazmózis)

Olvassa le az egymás melletti tesztcsíkot egyazon időben a tesztcsík tetejétől az aljáig, miközben megkeres minden olyan antigén sávot, amely a csarnokvízben (ah) **megtalálható, és** a szérumban (s) **hiányzik.**

Bármely olyan sáv, amely jól elkülönült felbontással rendelkezik a 120 kDa-nál kisebb molekulatömegű és *csak a csarnokvízben van jelen*, bizonyítja az anti-toxoplazma ellenanyagok helyi termelődését, utalva az okuláris toxoplazmózisra.



### **2. ábra. Okuláris toxoplazmózis – Példa a pozitív eredményre – (s= szérumban; c= csarnokvízben)**

*A profilok példaként szerepelnek. A csíkokat az "00011" tételből származó paraméterre jellemző "A" betűvel jelöltük.*

### Nagyon fontos pontok

1. A CIP-WB IgG/IgM eredményeket más klinikai, szerológiai, parazitológiai, epidemiológiai és orvosi képzési információk fényében kell értelmezni a kongenitális vagy az okuláris toxoplazmózis diagnózisának felállításakor.
2. A CIP-WB IgG/IgM negatív eredmény nem zárja ki a kongenitális vagy okuláris toxoplazmózis diagnózisát. Ezeket a betegeket folyamatosan szűrni kell, amíg a toxoplazmózis diagnózisa véglegesen nem igazolható vagy kizárható.
3. A sávok alakjai, méretei nagy mértékben változhatnak: keskeny, nagy, erősebb vagy gyengébb színű, intenzív, stb. Amikor ezt a vizsgálatot végezzük, akkor érdemes a ismert mintapárokat is beállítani, szerológiai profiljaikat összehasonlítani, annak érdekében, hogy megismerjék a sávok leolvasását. Kezdetben azt javasoljuk, hogy a CIP-WB leolvasását a laboratóriumban két személy önállóan végezze el. Különböző kiértékelések esetén a CIP-WB ellenőrzését el kell végezni.
4. A nagyon nagy molekulatömegű antigén frakciók nagyon közel állnak egymáshoz a tesztcsík felső részén, míg a közepes vagy alacsony molekulatömegű frakciók jobb felbontásúak. A 120 kDa-nál nagyon nagy molekulatömegű sávok nem használhatók a vizsgálat értelmezésére: az így megjelenő profil-különbségű



mintákat nem lehet pozitívnak tekinteni.

5. Ezzel ellentétben (kongenitális toxoplazmózis), a pozitív CIP-WB IgM-eken gyakran egy „triplet” (három nagyon könnyen felismerhető sáv) található, amelyek 75 és 100 kDa között találhatóak (lásd „T” 1. ábra 17-es jobb oldali szalag).
6. A születéskor (kongenitális toxoplazmózis) különös figyelmet kell fordítani a sávok intenzitásának bármilyen általános erősödésére (haemokoncentráció), ami arra utalhat, hogy a köldökzsinórvérben további sávok lehetnek. Csak az ilyen profilkülönbségeket mutató szérumokat negatívként tekinthetjük.
7. Ezzel ellentétben (kongenitális toxoplazmózis, okuláris toxoplazmózis), egy vagy két különálló sáv jelentős erősödéssel (gyakran szélességgel és intenzitással) jelenik meg, míg a többi sáv azonos vagy gyengébb intenzitást mutat, ami a pozitívítás kritériumának tekinthető.
8. Természetes ellenanyagok (kongenitális toxoplazmózis):  
Az immunoblot technika rendkívül érzékeny és a CIP-WB vizsgálathoz használt antigén lett kiválasztva a tesztsíkon jelenlévő antigén-sávok sokaságára.  
Számos publikáció említi az immunoblot által kifejlődött sávokat olyan személyeknél, akik soha nem kerültek kapcsolatba a toxoplazmózissal. Ezen antitesteket (IgG és IgM) más technikákkal csak ritkán kimutathatók, de az immunoblot nagyon gyakran észleli. Ezek a keresztreakcióknak köszönhetőek a még meghatározható természetű immunogének elleni ellenanyagokkal.  
Ez az oka annak, hogy a **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** teszt a profilok összehasonlítására alkalmas (Az IgG szerológiai megerősítésére, használja az erre a célra szánt specifikus **LDBIO TOXO II IgG** tesztet).  
Az újszülöttek nem mutatnak természetes ellenanyagot (az átadott anyai ellenanyagok kivételével), de a természetes ellenanyagok megjelenésének valószínűsége 3 hónap elteltével növekednek a csecsemő korával; csak ritkán található meg a 3 és 6 hónap között. Ez az oka annak, hogy a CIP-WB IgG/IgM indikációja a születés utáni monitorozás során szándékosan korlátozódik az IgG esetében 3 hónapra, míg az IgM esetében 1 hónapra.
9. „Heat Shock Protein” (kongenitális toxoplazmózis): Nem specifikus, keskeny sáv, amely gyenge, de változó intenzitású, 37 kDa-ig terjedő IgM-ben jelen lehet. Ez egy műtermék, amely az antigén előállításakor jelenik meg és úgy hívják, hogy „Heat Shock Protein”. Az anya-gyermek mindkét tesztsíkon megjelenik, de néha sokkal kifejezettebben tűnik bizonyos szérumok során a gyermek szűrővizsgálata alatt. Ne vegye figyelembe ezt a sávot.
10. A CIP-WB (okuláris toxoplazmózis): A CIP-WB IgM nem használható fel az okuláris toxoplazmózis diagnosztikájában. Másrészt, a CIP-IgA diagnosztikai jelentőségű. A CIP-IgA-val kapcsolatos további információkért kérjük, vegye fel velünk a kapcsolatot.

## HASZNÁLAT KORLÁTOZÁSA

- A fertőző betegség diagnózisa nem állapítható meg egyetlen vizsgálati eredmény alapján.
- A diagnózis felállítása érdekében a szerológiai eredményeket a rendelkezésre álló információk (pl. Epidemiológia, klinikai, képalkotás, biológia stb.) Ezek nem használhatók a diagnózis alapjául pusztán a pozitívításuk alapján.

## TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐK (lásd az irodalmi hivatkozásokat 11. oldal)

Ezeket a vizsgálatokat független referencialaboratóriumok végezték

### CIP-WB G+M: KONGENITÁLIS TOXOPLASMOSIS születéskor (anya/gyermeke)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZITÍV	NEGATÍV
KLINIKAI ADATOK	POZITÍV KT n = 54	41	13
	NEGATÍV KT n = 60	0	60

1. **táblázat:** CIP-WB IgG / IgM teljesítménye születéskor (n = 114), KT = kongenitális toxoplazmózis

**Specifitás = 100%**

**Pozitív prediktív érték = 100%**

**Szenzitivitás = 76%**

**Negatív prediktív érték = 83%**

**CIP-WB G+M: KONGENITÁLIS TOXOPLASMOSIS a szülés utáni monitorozó vizsgálat során (gyermek D0/D20; D = nap)**

A korábban D0 napnál vizsgált 54 gyermekből (1. táblázat) 10 nem fertőzött és 12 fertőzött gyermek (n=22) volt monitorozva a D20 napig és retrospektív analízis alá vetették a **TOXOPLASM WB IgG-IgM kittel**.

- **D0 nap:** 12 fertőzött gyermek közül 4 nem mutatott eltérést a születéstől (fals negatív).
- **D20 nap:** Egyetlen egy gyermek marad negatív.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZITÍV	NEGATÍV
KLINIKAI ADATOK	POZITÍV KT n = 12	11	1
	NEGATÍV KT n = 10	0	10

**2. táblázat:** CIP-WB IgG / IgM teljesítménye a D20 napon (n = 22), KT = kongenitális toxoplazmózis

**Specifitás = 100%**

**Pozitív prediktív érték = 100%**

**Szenzitivitás = 92%**

**Negatív prediktív érték = 91%**

**CIP-WB IgG: OKULÁRIS TOXOPLASMOSIS (szérum/csarnokvíz)**

A referencia központok által publikált négy tanulmány meta-analíziséből származó teljesítmények az alább kerülnek bemutatásra.

Ezek a tanulmányok összehasonlítják a CIP-WB **IgG** teljesítményét a Goldmann Witmer Koefficienssel (GWC) és PCR-rel. Ezek megmutatják a diagnosztikai teljesítményeket, melyeket két vagy három ilyen módszer kombinációjával kapunk meg.

Ezen négy tanulmány mindegyike használja az LDBIO tesztet a kit használati utasításában szereplő ajánlásoknak megfelelően.

Az érzékenységet 113 beteg esetében határozták meg, akik klinikailag igazolt okuláris toxoplazmózist mutattak. A specifitást egy kontroll populáción számították ki, amely a toxoplazmás fertőzéstől eltérő szemészeti körülményt mutatott: okulár toxocariasis (n=5), virális fertőzés (n=10), más fertőzés (n=4), nem fertőző szemészeti körülmények (n=126), amelyekből a szürkehályog (n=42).

**Szenzitivitás (Se):**

A CIP-WB IgG általános érzékenysége **62,8%** (n=113), teljesítménye hasonló a GWC-hez (Se = 61,0%, n=113) és nagyobb, mint a PCR (Se = 43,5%, n=92, p=0,0028).

A CIP-WB, a GWC és a PCR kombinációja javítja a diagnózis érzékenységét:

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

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

**Specifitás (Sp):**

A CIP-WB IgG általános specifitása **92,8%** (n=111), teljesítménye hasonló a GWC-hez (Sp=94,2%, n=139) és kisebb a PCR-nél (Sp=100%, n=131, p=0,0009).

A két módszer kombinációja, a CIP-WB IgG + GWC, enyhén csökkenti a diagnózis specifitását (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). A PCR-rel való kombináció nem befolyásolja a specifitást.

## Következtetés

A **Toxoplasma WB IgG IgM** immunvizsgálat kiváló teljesítményt nyújt a veleszületett vagy a szem toxoplazmózisának diagnosztizálásában.

Veleszületett toxoplazmózisban a CIP-WB G + M érzékenysége születéskor **76%** [95CI 62-86%], specificitása **100%** [95CI 92-100%]. Az élet első hónapjában végzett újbóli tesztelés tovább növeli a CIP-WB G + M érzékenységét.

A szem toxoplazmózisában a CIP-WB IgG érzékenysége születéskor **62,8%** [95CI 53,2-71,6%], specificitása **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Más technikákkal (GWC és / vagy PCR) való kombináció növeli a diagnosztikai teljesítményt.

## Reprodukálhatóság

Megvizsgálták a sorozatok közötti és a lot-ok közötti reprodukálhatóságot. Mindkét esetben, a szérum-szám korreláció a specifikus sávok vonatkozásában kiválóan bizonyult.

## Interferencia

Habar a hemolizált, ikterikus vagy lipides szérumok esetében nem tapasztaltunk különös keresztreakciót, ajánlatos az ilyen minták feldolgozásakor a kapott eredményeket körültekintően értelmezni.

## HIBAELHARITAS

**"A sávok kevésbé kontrasztosak"**: Bizonyos alacsony ellenanyag-tartalmú szérumok ilyen eredményeket adhatnak.

**"Árnyékolt területek láthatók, többé-kevésbé színesek, egyhén diffúzak"**: A tesztcsík nem volt teljesen egyik reagensbe alámerítve és nem volt a leírtaknak megfelelően (teljes időhossz) inkubálva. Foltok megjelenhetnek ott is, ahol a minta rá lett téve a tesztcsíkra, ha a tálca nem volt rázatva a reagensek adagolását követően.

**"A háttérzaj nagyon jelentős, így a tesztcsík leolvasása nagyon nehézkes"**: A mosás elégtelen volt, vagy az utolsó inkubáció túl sokáig tartott. Ügyeljen a vizsgálat megfelelően történő kivitelezésére, tartsa be a mosási időket, és biztosítsa a víz minőségét. Csökkentse le az utolsó inkubáció idejét. Kivételes esetben, bizonyos szérumok nem specifikus módon reagálhatnak. Ezek után az immunoblot eredményt nem lehet kiértékelésre felhasználni.

Ez a nem-specifikus háttérzaj magába foglalhatja a tesztcsík egy részét, így az eredmények az adott terület számára értelmezhetetlenek.

**"A színfejlődési utolsó lépésben az oldatban csapadék jelenik meg"**: a szubsztrát valójában részlegesen kicsapódik (fekete pelyhek) a pufferben a színfejlődés végén. Ez a jelenség nem változtatja meg a színfejlődés minőségét, melyet szükséges tovább folytatni. Az utolsó desztillált vizes mosás eltávolítja ezen szilárd részecskéket.

## BIBLIOGRAFIA

- 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).

#### ÉRTESÍTÉS A FRISSÍTÉSÉRŐL - olvassa el figyelmesen

KIADÁS DÁTUMA	VERZIÓ	MÓDOSÍTÁS ÖSSZEFOGLALÓ
26/07/2021	Vs 18	A biztonsági figyelmeztetés eltávolítása R5 - Kapcsolattartó e-mail címe – NaN3 EUH 032
29/07/2022	Vs 19	R6 NaN3 nélkül. A betűvel jelölt szalag. Különböző tételekből származó reagensek lehetséges használata.
30/11/2022	Vs20	Új cím



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](http://www.ldbiodiagnostics.com) – info@ldbiodiag.com