

LDBIO TOXO II IgM CE0459



CONFERMA

Diagnostica *in vitro* Immunoblot test
Tecnica Semiautomatica / manuale

#TOXO II 24M : 24 test

#TOXO II 12M : 12 test

#TOXO II 96M : 96 test

ISTRUZIONI PER L'USO

Per ulteriori informazioni e istruzioni per l'uso nella tua lingua, visita il nostro sito Web
www.ldbiodiagnostics.com

DESTINAZIONE D'USO

LDBIO-TOXO II IgM è un monouso test qualitativo per la diagnosi delle IgG sieriche con analisi Immunoblot della toxoplasmosi intesa come analisi di conferma dei risultati positivi o dubbi ottenuti con le classiche analisi di screening. Il Test può essere eseguito su siero.

PRINCIPIO DEL TEST

La tecnica Western Blot

Gli antigeni della *Toxoplasma gondii*, dopo l'isolamento mediante elettroforesi, con l'esecuzione dell'elettroblot si legano alla superficie della membrana di nitrocellulosa (denominata transfer) suddivisi in 24 strisce numerate da 1 a 24.

Principio del test

Ciascun campione di siero da analizzare viene incubato separatamente con una striscia. Gli anticorpi specifici, potenzialmente presenti nel campione, si legano in modo selettivo agli antigeni. Le IgM umane coniugate a fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi. Gli immunocomplessi formati reagiscono con il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi specifici di classe IgM presenti nel campione appaiono come strisce trasversali di colore viola.

REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Default: confezione da 24 test (#TOXO II 24M)

Corsivo: confezione da 12 test (#TOXO II 12M) - **Grassetto**: Confezione da 96 test (#TOXO II 96M).

Cod.	Q.tà	Descrizione	Composizione
R1	1	Confezione da 24 (12, 4x24) STRISCE: standard pretagliate + colorate. (Ogni cartella e ogni adesivo sono identificati da un numero di serie univoco)	Nitrocellulosa sensibilizzata. Peso molecolare colorati (kDa): blu: 250, blu: 150, blu: 100, rosa: 75, blu: 50, verde: 37, rosa: 25, blu: 20, blu: 15.
R2	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di BUFFER DILUENTE SIERI (pronto all'uso, soluzione rosa).	Buffer + tensioattivo.
R4	1	Fiala/e da 30 (30, 2x60) ml di CONIUGATO ANTI IgM (pronto all'uso, soluzione gialla).	Buffer + sieri policlonali di capra con anti-IgM umane coniugati con fosfatasi alcalina + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.
R5	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di SUBSTRATO (pronto all'uso, fiala marrone opaca).	Buffer + NBT + BCIP + stabilizzatori.
R6	1	Fiala da 60 (60, 250) ml di 10 SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA (da diluire in 10 parti di acqua distillata; soluzione incolore).	Buffer + tensioattivo.
R10	1	Provetta da 100 (100, 2x100) µl di SIERO DI CONTROLLO POSITIVO (pronto all'uso; cappuccio rosso).	Buffer + serie di sieri umani positivi per sierologia Toxoplasma + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.

R1: La lettera prima di ogni numero di striscia è specifica per il parametro.

R2, R4, R5 e R6 sono uguali per tutti i kit e hanno un unico numero di lotto che dipende esclusivamente dalla data di produzione. **Si raccomanda di eseguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.**

R10 è calibrato in immunoblot secondo un lotto di riferimento ed è dedicato esclusivamente a questa tecnica.

R4, R10 (NaN₃): EUH 032 - A contatto con acidi libera gas molto tossici.

EUH 210 Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta e sul nostro sito web www.ldbiodiagnostics.com.

ALTRO MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NELLA FORNITURA

- Vassoi di incubazione multi-canale in polipropilene per miniblot (#WBPP-08 o equivalenti).
- Piattaforma oscillante per immunoblot, sistema di aspirazione per liquidi (le vaschette #WBPP-08 da noi fornite possono essere svuotate semplicemente capovolgendole).
- Provette e materiale per il prelievo dei campioni, cilindri graduati, contenitori adatti. Pipette automatiche, micropipette e punte usa e getta (10 µl, 1,2 ml e 2 ml di volume).
- Acqua distillata o deionizzata. Carta assorbente (es. carta da filtro Whatman), nastro adesivo trasparente.
- Guanti, pinzette per maneggiare le strisce, cutter o bisturi, righello piatto trasparente.

Nota: I nostri reagenti possono essere utilizzati in un preparatore immunoblot automatico. **Prestare attenzione alle possibili contaminazioni chimiche dei nostri reagenti se il preparatore viene anche usato con reagenti di altro produttore** (per es. è nota la contaminazione da TWEEN 20), e alle contaminazioni batteriche. Tenere scorte di fiale per il preparatore. Dopo l'uso, non riporre i residui di reagente nelle fiale originali.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare tra 2 e 8 °C. I reagenti contenuti nel kit sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla scatola esterna e sulle etichette delle fiale. Non utilizzare reagenti contaminati o torbidi. Il buffer di detergente diluito a 1/10 è stabile per due mesi a temperature comprese fra +2 e +8 °C e per una settimana a temperatura ambiente.

PRECAUZIONI D'USO

Sicurezza

- Solamente per uso *in vitro*. Solo per uso professionale. Solo per personale tecnicamente preparato. Maneggiare secondo le Buone pratiche di laboratorio (BPL) e considerare ogni reagente e ogni campione come potenzialmente tossici e/o infettivi.
- Indossare il camice, guanti e occhiali da laboratorio; non bere, mangiare o fumare all'interno del laboratorio. Non mettere in bocca le pipette.
- Il controllo positivo è un siero di origine umana che è stato inattivato per i virus HIV 1 e 2, dell'epatite B e dell'epatite C. Deve comunque essere maneggiato come un prodotto potenzialmente infettivo.
- Il substrato contiene una miscela di NBT e BCIP, tossica al tatto (per pelle e mucose) e per inalazione.
- I reagenti contengono sodio azide, che può generare sali metallici esplosivi a contatto con piombo e rame. Sciacquare ogni residuo con acqua.
- Smaltire i materiali di scarto (campionature, beccucci, provette, liquido detergente, reagente usato...) secondo le buone pratiche previste dal settore e dalle normative nazionali attualmente in vigore.
- Ogni incidente grave deve essere oggetto di una dichiarazione al fabbricante e all'autorità competente.

Precauzioni

- Leggere e interpretare i risultati alla luce bianca diretta.
- È preferibile utilizzare tutti i reagenti dello stesso lotto. Se si utilizzano lotti diversi, assicurarne la tracciabilità.
- Usare le strisce in ordine numerico. Non mescolare strisce provenienti da lotti con numeri di serie diversi; usare le etichette in sequenza progressiva. Programmare un piano di distribuzione specifico prima di iniziare il test.
- Non toccare le strisce con le dita; usare le pinzette.

- I reagenti devono essere miscelati bene prima dell'uso, soprattutto il buffer di detergente concentrato.
- Chiudere le fiale dopo l'uso; non usare i reagenti se accidentalmente contaminati da un'altra sostanza. Non usare il reagente contenuto in una fiala che presenta segni di perdite. Non usare la soluzione se appare torbida o sedimentata.
- Per le pipette usare solamente punte usa e getta. Evitare qualunque contaminazione tra i vari canali. Verificare l'eventuale formazione di schiuma o bolle all'interno delle punte delle pipette (contaminazione batterica delle fiale di reagente).
- I vassoi di incubazione devono essere lavati solamente con acqua pulita seguita da acqua distillata (non usare mai detersivi o candeggianti).
- L'omissione di un campione o la distribuzione di volume inadeguato può rendere negativo o positivo il risultato del test, indipendentemente dalle condizioni specifiche.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Raccogliere i campioni in modo asettico all'interno di provette asciutte. La quantità minima richiesta è di 10 µl di siero.

Conservare i campioni a temperatura di 2-8 °C fino al momento dell'utilizzo. Nel caso sia necessaria la refrigerazione più di una settimana, congelare i campioni a temperatura di -20 ± 5 °C. Non utilizzare i campioni contaminati. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

Sebbene nessuna particolare reazione incrociata sia stata osservata con il siero emolitico, itterico o lipidico, si raccomanda di interpretare i risultati di tali campioni con cura.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione di Lavaggio: Per 4 test: in una bottiglia pulita, diluire 10 ml di detergente concentrato 10X (**R6**) in 90 ml di acqua distillata o deionizzata. Fare attenzione a mescolare bene il tampone diluito.

COME SI ESEGUE IL TEST

N.B.: Si raccomanda di seguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

1. Programmare un piano di distribuzione dei campioni e del controllo positivo a C+ (**R10**).

Solamente usando questo controllo il test è tecnicamente valido ed è possibile identificare, per un determinato numero di serie, le strisce generate. Una striscia C+ non può essere utilizzata per interpretare i risultati delle strisce generate da un diverso numero di serie.

2. Tagliare il numero richiesto di strisce (R1) con un bisturi e un righello trasparente piatto, pulito e asciutto, tenendo la riga blu di posizionamento sulle strisce: tenere ben ferme le strisce con il righello e tagliarle lungo il lato in cui si esercita la pressione (i numeri sono leggibili attraverso il righello).
3. Distribuire 1,2 ml di tampone di diluizione (R2) in ciascun canale secondo il piano di distribuzione stabilito.
4. Far reidratare le strisce per circa 2 minuti, adagiandole sul buffer con il numero ben visibile in alto, dopo agitare delicatamente il vassoio e farle immergere completamente nel buffer.
5. Distribuire i campioni e il controllo/i positivo/i: in base al piano di distribuzione, in misura di 10 µl per canale. Agitare delicatamente il vassoio dopo ogni erogazione. Posizionare il vassoio su una piattaforma oscillante. **Mettere in incubazione per 90 min ± 5 min a 20-26 °C.**
6. Fase di lavaggio: Eliminare il contenuto dai canali usando una pipetta Pasteur o capovolgendo il vassoio di incubazione.

Versare da 2 a 3 ml di soluzione di lavaggio in ciascun canale. Mettere in incubazione sulla piattaforma di agitazione per 3 min. Ripetere l'operazione due volte, quindi eliminare il contenuto dai canali. Assicurarsi che le strisce non si capovolgano durante questi passaggi.

7. Versare 1,2 ml di coniugato anti-IgM (R4) in ciascun canale. Posizionare il vassoio sulla piattaforma oscillante. **Tenere in incubazione per 60 min \pm 5 min a 20-26 °C.**
8. Fase di lavaggio: ripetere la fase 6.
9. Distribuire 1,2 ml di substrato NBT/BCIP (R5) in ciascun canale. Posizionare sulla piattaforma oscillante proteggendo dalla luce diretta. **Tenere in incubazione per 60 min \pm 5 min a 20-26 °C.**

Indipendentemente dal parametro, tenere sotto controllo lo sviluppo del colore. Il processo può essere interrotto se il colore di fondo della striscia si scurisce rendendo difficoltosa la lettura (la qualità delle fasi di lavaggio influisce fortemente sulla colorazione di fondo). Ricordare che asciugando le strisce schiariscono.

10. Interrompere la reazione aspirando il substrato con una pipetta di Pasteur o capovolgendo la vasca di incubazione e versando 2 ml di acqua distillata nei canali. Ripetere quest'ultimo passaggio di lavaggio ancora una volta.
11. Asciugatura delle strisce: Con i canali ancora pieni di acqua, prendere le strisce dal lato numerato con le pinzette e depositarle, con il numero visibile, su carta da filtro Whatman. Fare asciugare all'aria. Il colore delle strisce si schiarisce naturalmente durante l'asciugatura. L'interpretazione deve essere eseguita dopo la completa asciugatura.
12. Conservazione: Trasferire le strisce su un foglio di carta, che servirà per archivarle. Allineare le righe di posizionamento. Tenendole ferme con il righello piatto, fermare le strisce sulla sommità con del nastro adesivo trasparente.

Per una buona interpretazione, le strisce devono essere ordinate per etichetta adesiva in sequenza numerica, distanziate tra loro alcuni millimetri al massimo. Non è affidabile effettuare il confronto di strisce molto distanziate tra loro (es. la striscia n. 2 con la n. 15). **È pericoloso** (falsi risultati) effettuare il confronto di strisce provenienti da confezioni diverse (strisce con numeri di serie diversi).

CONTROLLO QUALITÀ E INTERPRETAZIONE

Il controllo del siero (R10) fornito nella confezione deve essere sistematicamente incluso in qualsiasi serie di immunoblot. Mostra il profilo di riferimento e garantisce (1) tecnicamente la riuscita del test (le bande devono apparire in modo evidente sulla striscia) e (2) la calibrazione precisa della posizione e dell'aspetto delle bande specifiche, consentendo l'interpretazione dei risultati delle strisce provenienti dallo stesso adesivo (con lo stesso numero di serie).

Nota Bene: il profilo del controllo positivo (R10) può variare in base al numero di lotto dei reagenti utilizzati. Le immagini corrispondenti sono disponibili sul nostro sito web www.ldbiodiagnostics.com come esempio.

Descrizione delle bande colorate

Un campione positivo può presentare molte bande situate tra 15 e 200k Kilo-Dalton (kDa). Ricercare la presenza di bande nella zona da 30-40 kDa per ciascuno dei campioni esaminati utilizzando gli strumenti di calibrazione sopra descritti.

Tali bande, raggruppate e ben isolate, sono caratteristiche e generalmente molto facili da individuare.

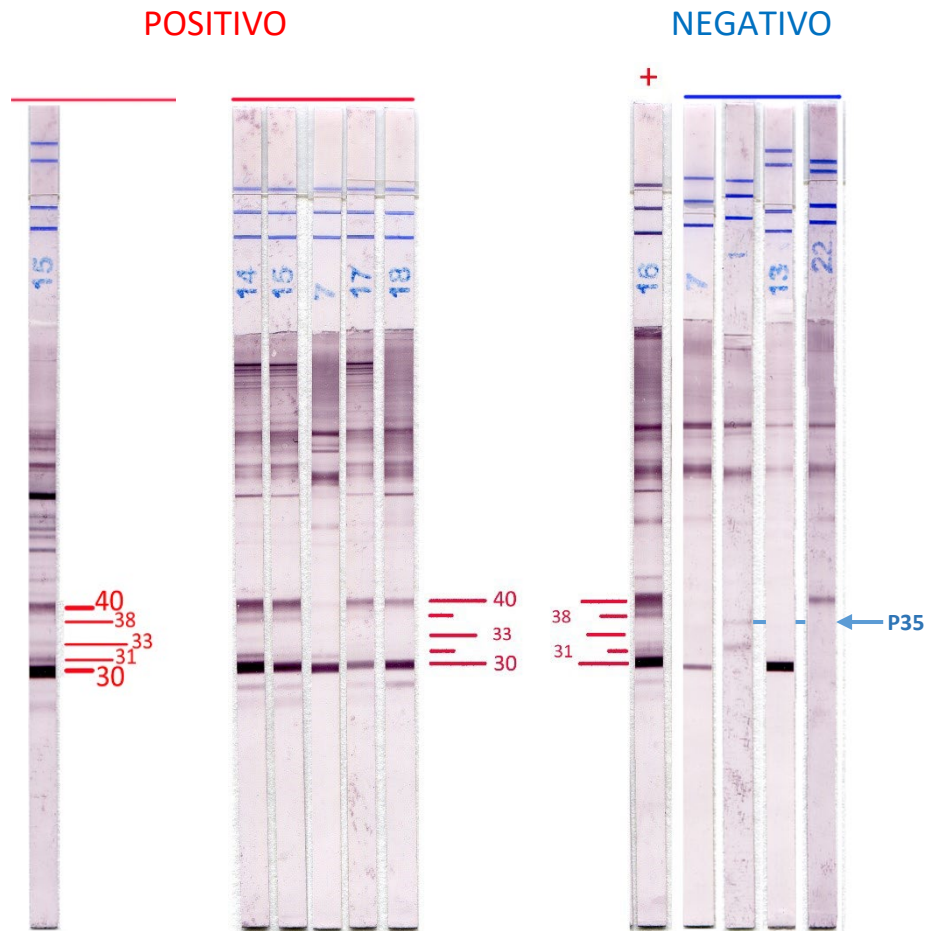


Fig. 1: Esempi di risultati positivi e negativi (peso molecolare: kDa)

I profili sono forniti a titolo di esempio. Le strisce sono contrassegnate dalla lettera "K" specifica per il parametro del lotto "50016".

Interpretazione

La presenza sulla striscia **di almeno 2 bande delle bande specifiche P30, P31, P33, P38 e P40, E l'inclusione della banda P30 kDa**, consente di interpretare il test come positivo e di concludere che gli anticorpi IgM anti-T. gondii sono presenti nel campione analizzato.

Note Bene:

- Le bande presenti più frequentemente in caso di debole positività sono la **P30 e la P40**.
- Possono essere osservate altre bande (e.g. **P35**) **Non vengono prese in considerazione nella lettura del test.**

Per convalidare i risultati, raffrontare sempre il profilo dell'immunoblot di ogni campione con quello del controllo positivo su R10. L'aspetto delle bande colorate è importante per l'interpretazione del test.

LIMITAZIONI D'USO

- La diagnosi di infezione non può essere definita sulla base del risultato di un singolo test.
- Per poter definire la diagnosi i risultati del siero devono essere interpretati sulla base dei dati disponibili (es. epidemiologici, clinici, radiologici, biologici). Non dovrebbero essere utilizzati come base per la diagnosi sulla base della loro sola positività.

PRESTAZIONI (VEDI BIBLIOGRAFIA)

La valutazione delle performances diagnostiche del test è stata fatta in 4 centri di riferimento per la diagnosi della con uno studio multicentrico.

Sono stati analizzati 2 gruppi di di sieri da donne in gravidanza IgM positive : il primo gruppo era costituito 93 sieroconversioni accertate (229 campioni) , il secondo da 68 casi di falsa positività (158 campioni) definiti in i nei centri partecipanti con le metodiche in uso.

Ogni centro ha utilizzato il proprio pannello di tecniche IgM, consentendo un confronto delle prestazioni del WB con 6 kit disponibili in commercio.

1. Performance del test WB II IgM nella conferma di sieroconversioni

Sensibilità: il test è risultato positivo in 91 delle 93 sieroconversioni confermando l'infezione da T. gondii.

$$Se = 97.8\% (95CI [91.7-99.6\%])$$

Specificità: Il WB Toxo II IgM è risultato negativo in 61 dei dei 68 casi con IgM falsamente positive confermando l'assenza di infezione da T.gondi.

$$Sp = 89.7\% (95CI [79.3\%-95.4\%]).$$

2. Studio comparativo delle prestazioni del WB Toxo II IgM, campione per campione:

Tutti i risultati del WB sono stati paragonati a quelli ottenuti con le tecniche in uso nei diversi laboratori .

Questi dati dettagliati sono stati pubblicati: "*Diagnostic Accuracy of LDBIO-Toxo II IgG and IgM Western Blot in Suspected Seroconversion in Pregnancy: A Multicentre Study*". *Pathogens* **2022**, *11*(6), 665. doi: 10.3390/pathogens11060665 / Supplementary material File 1.

Il WB mostra una sensibilità equivalente e una specificità più elevata rispetto a tutte le altre tecniche utilizzate.

L' accuratezza diagnostica del WB giustifica il suo utilizzo per confermare i risultati ottenuti con i test di screening per IgM (risultati dubbi, debolmente positivi o di difficile interpretazione).

Riproducibilità:

La riproducibilità all'interno delle serie e dei lotti è stata testata. In entrambi i casi, la correlazione esistente tra siero e siero rispetto alle specifiche bande colorate è eccellente.

Interferenze:

Sebbene nessuna particolare reazione incrociata sia stata osservata con il siero emolitico, itterico o lipidico, si raccomanda di interpretare i risultati di tali campioni con cura.

RICERCA E SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMATICHE

“Le bande colorate sono tenui e hanno poco contrasto”: Alcuni sieri con bassa concentrazione di anticorpi possono dare risultati di questo tipo.

“Si vedono zone sfumate, più o meno colorate, appena diffuse”: La striscia non è stata completamente immersa in uno dei reagenti e non è stata incubata correttamente su tutta la lunghezza. Possono anche comparire delle macchie nel punto di appoggio del campione, se il vassoio non è stato ben agitato dopo l'erogazione.

“Il rumore di fondo è notevole e rende la lettura molto difficoltosa”: I lavaggi non sono stati sufficienti oppure l'ultima incubazione è durata troppo. Assicurarsi di seguire le giuste tecniche procedurali, rispettare i tempi di lavaggio e assicurarsi della qualità dell'acqua. Ridurre il tempo dell'ultima incubazione. Eccezionalmente, alcuni sieri reagiscono in modo anomalo. Pertanto, il risultato dell'immunoblot non è utilizzabile. Questo rumore di fondo anomalo può interessare solamente parte della striscia, rendendo impossibile l'interpretazione di quella sola parte.

“Durante l'ultima fase di sviluppo nella soluzione compare un precipitato”: il substrato potrebbe in parte precipitare (fiocchi neri) nel buffer alla fine dello sviluppo. Questo fenomeno non altera la qualità dello sviluppo che deve proseguire normalmente. L'ultimo lavaggio con acqua distillata elimina le particelle solide eventualmente presenti.

BIBLIOGRAFIA

- Meroni V, Genco F, Scudeller L, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, L'Ollivier C, Paris L, Pelloux H. « Diagnostic Accuracy of LDBIO-Toxo II IgG and IgM Western Blot in Suspected Seroconversion in Pregnancy: A Multicentre Study ». *Pathogens* **2022**, 11(6), 665. doi: 10.3390/pathogens11060665
- Franck J, Garin Y, et Dumon H. « LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection ». *Journal of clinical microbiology* 46, n° 7 (juillet 2008): 2334-38. doi:10.1128/JCM.00182-08.
- Jost C, Touafek F, Fekkar A, Courtin R, Ribeiro M, Mazier D, et Paris L. « Utility of immunoblotting for early diagnosis of toxoplasmosis seroconversion in pregnant women ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18, n° 11 (novembre 2011): 1908-12. doi:10.1128/CVI.05303-11.
- Robert-Gangneux F, et Darde ML. « Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 25, n° 2 (1 avril 2012): 264-96. doi:10.1128/CMR.05013-11
- Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, Paris L, Pelloux H, Villena I, et Candolfi E. « Serological Diagnosis of Toxoplasma Gondii Infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 18 septembre 2015. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009
- Liesenfeld O, Press C, Montoya JG, Gill R, Isaac-Renton JL, Hedman K, Remington JS. « False-positive results in immunoglobulin M (IgM) toxoplasma antibody tests and importance of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test ». *Journal of clinical microbiology*. 1997 Jan;35(1):174-8. doi: 10.1128/jcm.35.1.174-178.1997.
- Dhakal R, Gajurel K, Pomares C, Talucod J, Press CJ, Montoya JG. « Significance of a Positive Toxoplasma Immunoglobulin M Test Result in the United States ». *Journal of clinical microbiology*. 2015 Nov;53(11):3601-5. doi: 10.1128/JCM.01663-15.

- Petersen E, Borobio MV, Guy E, Liesenfeld O, Meroni V, Naessens A, Spranzi E, Thulliez P. « European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index ». *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43(4):1570-4. doi: 10.1128/JCM.43.4.1570-1574.2005.
- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessières MH, Blatz RM, et al. « Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii* ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2001 Jul;20(7):467–74. doi: 10.1007/pl00011289.
- Genco F, Lanzarini P, Chiaretto M, Prestla M & Meroni V. « Early diagnosis fo acute toxoplasmosis in IgG negative IgM positive pregnant women ». 25th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Poster. 2015
- Meroni V, Genco F, Corcione A ,Scudeller L, Brenier-Pinchart MP, Fricker-Hidalgo H, et al. « Diagnostic accuracy of toxoplasma western blot test in suspected seroconversion in pregnancy : a multicentric study ». *International Congress On Congenital Toxoplasmosis*. Poster. 2019.

NOTIFICA DI AGGIORNAMENTO: leggere attentamente

DATA DI RILASCIO	VERSIONE	RIEPILOGO DELLE MODIFICHE
20/06/2022	Vs 02	Performance: riferimento alla pubblicazione al posto della tabella
30/11/2022	Vs03	Nuovo indirizzo
02/01/2023	Vs04	R6 senza NaN3. Striscia identificata con la lettera. Possibile utilizzo di reagenti provenienti da lotti diversi.
06/02/2023	Vs05	Indicazione non specifica P35
20/06/2023	Vs06	Nome e riferimenti in blu



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