

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgA

Diagnostica *in vitro* Immunoblot test
Tecnica Semiautomatica / manuale

ISTRUZIONI PER L'USO

Questa metodica è complementare a quella del kit Toxoplasma IgG-IgM
(#TOP-WB24G, #TOP-WB12G, #TOP-WB96G)
e quella del coniugato anti-IgA umane (R8) (#WB-IA30, #WB-IA60).
**Il CIP-IgA non deve essere eseguito senza prima aver letto la metodica di
questi due prodotti.**

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

METODO D'USO: Estensione di applicazione del Kit TOXOPLASMA WB IgG-IgM

Il profilo immunologico comparativo (CIP-WB) IgA (CIP-IgA) è un test per la diagnosi di toxoplasmosi oculare attraverso la comparazione del profilo immunologico del siero e dell'umore acqueo del paziente. Deve essere eseguito **in aggiunta** al CIP-IgG descritto nel **TOXOPLASMA WB IgG-IgM kit**.

PRINCIPIO DEL TEST

Tecnica Western Blot

Gli antigeni di *Toxoplasma Gondii*, una volta separati tramite elettroforesi, sono legati attraverso elettroblotting alla superficie della membrana di nitrocellulosa (detto *Transfer*) tagliata in 24 strisce numerate da 1 a 24.

Conduzione del test

Il CIP-IgA deve essere eseguito contemporaneamente alla CIP IgG, come parte per la ricerca di toxoplasmosi oculare.

Il test consiste in incubare separatamente, **con due strisce contigue dallo stesso transfer**, i due diversi campioni (siero e umore acqueo), i cui profili immunologici devono essere comparati e successivamente evidenziati grazie all'azione della Fosfatasi alcalina – **il coniugato anti IgA (R8)** e il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi **specifici di classe IgA** presenti nel campione sono così mostrati nella forma di bande orizzontali violacee. La lettura è compiuta dalla successiva comparazione delle coppie di strisce IgG e IgM, permettendo così di evidenziare la possibile presenza di strisce presenti univocamente sulla striscia di un campione e non dell'altro (vedi: interpretazione)

REAGENTI FORNITI

Fare riferimento ai foglietti illustrativi del kit Toxoplasma WB IgG-IgM e del coniugato Anti-IgA (R8).

MATERIALE AGGIUNTIVO NECESSARIO MA NON FORNITO

- CIP-IgA è eseguito utilizzando il kit **TOXOPLASMA IgG-IgM (reagenti R1, R2, R5 e R6)** e il **coniugato LDBIO Diagnostics IgA (R8)**. Non usare con altra striscia o reagente.
- Fare riferimento alla metodica del kit **TOXOPLASMA IgG-IgM**

Nota bene: sebbene i nostri reagenti possano essere usati su un processore automatizzato per immunoblot, i tempi di incubazione del CIP-IgA sono diversi da quelli degli altri test LDBIO ed è quindi raccomandato di eseguire CIP-IgA secondo una tecnica manuale.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Fare riferimento ai foglietti illustrativi del kit **Toxoplasma WB IgG-IgM** e del **coniugato Anti-IgA (R8)**.

PRECAUZIONI D'USO

Fare riferimento alla metodica del kit **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**. Valgono anche le seguenti istruzioni:

- Non mescolare 2 fiale di coniugato IgA con numeri di lotto diversi.
- È preferibile utilizzare tutti i reagenti dello stesso lotto. Se si utilizzano lotti diversi, assicurarne la tracciabilità.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

È richiesta una quantità minima di 25 µl di siero e di umore acqueo. In particolare nel caso dell'umore acqueo l'uso di 50 µl aumenta la sensibilità del test (vedi procedura).

Conservare i campioni fra 2-8 °C fino al momento dell'esecuzione del test. Se devono essere conservati per più di una settimana congelare i campioni a -20 ± 5 °C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

PROCEDURA DEL TEST

NB: è suggerito l'uso del CIP-IgA in aggiunta all'uso di CIP IgG. Se il volume di umore acqueo non lo permette, è consigliato di preferire l'utilizzo di CIP-IgG rispetto a CIP.IgA.

Seguire i passaggi dall'1 al 4 della procedura descritte nelle istruzioni per l'uso del kit **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**

5. Distribuire i campioni secondo lo stabilito piano di distribuzione (passaggio 1). **Usare 25 µl di siero e 25-50µl (se possibile) di umore acqueo.** Agitare gentilmente ogni pozzetto dopo ogni deposizione. Sistemare su un oscillatore. Coprire la piastra di incubazione con una pellicola o con un foglio di alluminio.

Incubare tutta la notte (15 ore +/- 3 ore) a 20-26 °C.

Seguire i passaggi dal 6 al 12 descritti nella metodica del kit **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- È essenziale bloccare la colorazione di due strisce di una data coppia di una data classe di anticorpi in modo simultaneo, è tuttavia possibile stoppare in momenti diversi le diverse coppie di anticorpi, (le IgA presenti in minore concentrazione, normalmente si sviluppano più lentamente delle IgG).
- L'umore acqueo ha generalmente una concentrazione minore di anticorpi. Deve essere fornito il tempo necessario perchè la reazione si sviluppi correttamente, non bisogna preoccuparsi eccessivamente dello scurirsi delle strisce.

Sistemare fianco a fianco le strisce di IgA e IgG di ogni coppia di campioni secondo l'ordine progressivo dei loro numeri, seguendo il prestabilito ordine di distribuzione.

È assolutamente obbligatorio eseguire il confronto di un paio di campioni con strisce congiunte (numeri contigui) di un'unica confezione di strisce (stesso numero di serie). 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).

CONTROLLI DI QUALITÀ ED INTERPRETAZIONE

Descrizione delle bande

Un campione positivo può presentare un numero significativo di bande collocate fra i 15 e i 200 kDa. Solo le bande con un peso molecolare minore di 120 kDa possono essere usate per la comparazione dei profili.

Interpretazione

CIP-WB IgA (toxoplasmosis oculare)

Leggere le 2 strisce contigue simultaneamente dall'alto verso il basso facendo attenzione a qualsiasi banda antigenica presente sulla striscia relativa all'umore acqueo e assente su quella del siero.

Qualsiasi banda ben definita con un peso molecolare (PM) minore di 120 kDa e presente solo nell'umore acqueo, indica la sintesi locale di anticorpi anti-toxoplasma, a favore di toxoplasmosi oculare.

Punti fondamentali

1. I risultati del CIP-WB IgA devono essere interpretati alla luce degli altri status clinici, sierologico, parassitologico, epidemiologico e diagnostico per immagini al fine di arrivare alla diagnosi di toxoplasmosi oculare.
2. Un risultato negativo di CIP-WB IgA non esclude una possibile positività di toxoplasmosi oculare. Questi pazienti devono necessariamente essere soggetti a follow-up fino alla conferma o esclusione definitiva di toxoplasmosi oculare.
3. Le bande possono variare molto all'apparenza: sottili, spesse, più o meno colorate, intense... Si raccomanda, quando si utilizza questa tecnica, di avere a disposizione alcuni profili di comparazione con coppie di campioni noti, al fine di acquisire familiarità con la lettura. Si raccomanda inoltre che la lettura CIP-WB sia inizialmente effettuata da due persone in laboratorio. Nell'eventualità che ci siano due interpretazioni opposte, una CIP-WB di controllo deve essere effettuata.
4. Le frazioni antigeniche con peso molecolare (PM) molto alto sono molto vicine fra loro nella parte superiore della striscia, favorendo una migliore risoluzione delle frazioni con medio e basso peso molecolare. Le bande con PM > 120 kDa non possono quindi essere usate per interpretazione dei risultati: I profili che presentano differenze solamente fra queste bande non possono essere dunque interpretate come positive.

LIMITAZIONE D'USO

- La diagnosi di una malattia infettiva non può stabilirsi sulla base solamente di un risultato diagnostico.
- I risultati sierologici devono essere interpretati secondo le informazioni disponibili (epidemiologiche, cliniche, diagnostica per immagini, biologiche...) al fine di formulare una diagnosi. Non dovrebbero essere utilizzati come base per la diagnosi sulla base della loro sola positività.

PERFORMANCE (vedi riferimenti bibliografici)

Specificità – sensibilità

Protocollo

Le performance di CIP-IgA sono basate su due gruppi di pazienti di due Ospedali di referenza francesi. Uno dei due studi è stato pubblicato [Mathis et al, 2018]. Uno studio comprende 87 pazienti: 42 toxoplasmosi oculare positivi e 45 controlli con altre malattie oculari. L'altro comprende 59 pazienti: 24 casi di toxoplasmosi oculare e 35 controlli.

La performance di WB è data in termini di sensibilità e specificità. Gli intervalli di confidenza al 95% sono calcolati usando il metodo di Wilson con correzione di continuità.

Risultati

| | Casi | Controlli | Totale |
|--------|------|-----------|--------|
| WB+ | 21 | 0 | 21 |
| WB- | 45 | 80 | 125 |
| Totale | 66 | 80 | 146 |

Tabella 1: Performance di CIP-WB IgA

WB IgA sensibilità 31,8% [21.2-44.6%] WB IgA Specificità = 100% [94.3-100%]

Notare che 7 sieri (10.6% [4.7-21.2%]) erano positive solamente per le IgA e non sarebbero stati rilevati da un CIP-IgG.

Conclusione

Il profilo comparativo IgA WB mostra una specificità eccellente in entrambi gli studi (100% [94.3-100%]).

Ha una bassa sensibilità (31.8% [21.2-44.6%]) ma può positivizzarsi mentre WB IgG è negativo all'incirca nel 10% (10.6% [4.7-21.2%]) dei casi di toxoplasmosi oculare. La ricerca complementare delle IgA, in aggiunta alle IgG, nel contesto di una sospetta toxoplasmosi oculare aumenta quindi la sensibilità della comparazione WB dei profili 75.7% (50/66 [63.4%-85.1%]).

Riproducibilità

La riproducibilità intra-serie e intra-lotto è stata testata. In entrambi i casi, la correlazione siero-siero con attenzione alle bande specifiche è eccellente

Interferenze

Sebbene nessuna particolare cross-reazione è stata osservata con siero emolizzato, itterico o lipidico, è raccomandabile interpretare i risultati di tali campioni con attenzione.

RICERCA E SOLUZIONE DI EVENTUALI PROBLEMATICHE

Fare riferimento alla metodica di **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

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).
- Mathis, T. *et al.* Comparison of Immunoblotting (IgA and IgG) and the Goldmann-Witmer Coefficient for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis in Immunocompetent Patients. *Br J Ophthalmol.* **102** (10): 1454-58.
- Robert-Gangneux, F. *et al.* Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 34–38 (2004).
- Talabani, H. *et al.* Contributions of Immunoblotting, Real-Time PCR, and the Goldmann-Witmer Coefficient to Diagnosis of Atypical Toxoplasmic Retinochoroiditis. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 2131–2135 (2009).
- Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2015).

NOTIFICA DI AGGIORNAMENTO: leggere attentamente

| DATA DI RILASCIO | VERSIONE | RIEPILOGO DELLE MODIFICHE |
|------------------|----------|--|
| 09/08/2021 | Vs 04 | Tempo di incubazione notturna - Indirizzo e-mail di contatto |
| 28/09/2022 | Vs 05 | Indicazione R8 - indirizzo LDBIO - presentazione della procedura del test- utilizzo di reagenti provenienti da lotti diversi |



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