

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

Diagnostica *in vitro* Immunoblot test
Semi-automatizzato / manual

#TOP-WB24GM: 24 tests
#TOP-WB12GM: 12 tests
#TOP-WB96GM: 96 tests

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

TOXOPLASMA WB IgG-IgM è un test monouso di immunoblot di confronto dei profili immunologici (CIP-WB) IgG e IgM per la diagnosi di:

- Toxoplasmosi congenita alla nascita (G0): CIP-WB G+M tra sangue materno e il sangue del cordone ombelicale.
- La toxoplasmosi congenita nel follow-up post-natale (G + N): CIP-WB G+M tra il sangue del cordone al giorno G0 e il sangue del bambino a G + N.
- La toxoplasmosi oculare: CIP-WB IgG tra il siero del paziente e l'umore acqueo.

Questo test non è destinato al test diagnostico o alla conferma di sierologie isolate. Per questa applicazione, utilizzare il test **LDBIO TOXO II IgG** (Ref. TOXO II IgG WB).

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.

Conduzione del test

Nota: Il test immunoblot IgG e IgM descritti di seguito vengono eseguiti simultaneamente al momento della manipolazione.

Immunoblot IgG

Il test consiste nell'incubare separatamente, **2 strisce contigue della stessa confezione di strisce**, i due campioni (sieri, umor acqueo) di cui si vogliono confrontare i profili immunologici.

- Passo 1: Ciascun campione di siero (o umor acqueo) da analizzare viene incubato separatamente con una striscia. Gli anticorpi anti-*Toxoplasma*, potenzialmente presenti nel campione, si legano in modo selettivo agli antigeni della *T. gondii*.
- Passo 2 : **Le IgG umane** coniugate a fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi anti-*toxoplasma*..
- Passo 3 : Gli immunocomplessi formati reagiscono con il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi *anti-toxoplasma di classe IgG* presenti nel campione appaiono come strisce trasversali di colore viola.

Immunoblot IgM

Il test è identico in linea di principio, sostituendo al punto 2 il coniugato precedente con un coniugato fosfatasi alcalino - **anti-IgM umano**. La rivelazione metterà quindi in evidenza le bande antigeniche riconosciute dagli anticorpi anti-*toxoplasma di classe IgM* presenti nei campioni.

Lettura

Il successivo confronto delle coppie di strisce IgG e successivamente IgM consente di rilevare l'eventuale presenza di bande rivelate unicamente da uno dei campione e non dall'altro (cf. § Interpretazione).

REAGENTI FORNITI

Default: confezione di 24 test (#TOP-WB24GM)

Corsivo: confezione da 12 test (#TOP-WB12GM) - **Grassetto**: Confezione da 96 test (#TOP-WB96GM).

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.
R3	1	Fiala/e da 30 (30, 60) mL di CONIUGATO ANTI IgG (pronto all'uso, soluzione blu).	Buffer + sieri policlonali di capra con anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.
R4	1	Flaconi(i) da 30 (30, 60) mL di CONIUGATO ANTI-IgM (pronto all'uso - soluzione giallo).	Buffer + siero policlonali di capra anti-IgM umani coniugato con la fosfatasi alcalina + NaN3 (< 0.1%) + stabilizzanti.
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.

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

R2, R3, 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.**

R3, R4, (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 miniblott (#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, 25µL, 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 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 detergenti 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 35 µL di siero o 10µL di umor acqueo. Nel caso di umor acqueo, usare 25 µL aumenta la sensibilità del test (Consultare § Come si Esegue Il Test).

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

Nota Bene: 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. Preparare il piano di distribuzione dei campioni.

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).

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.
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 secondo il piano di distribuzione stabilito (punto 1) e i volumi indicati qui avanti:

	Siero	Umor acqueo
IgG	10µL	10 o 25µL
IgM	25µL	-

Nel caso di umor acqueo, usare 25 µL aumenta la sensibilità del test. Agitare delicatamente il vassoio dopo ogni erogazione. Posizionare il vassoio su una piattaforma oscillante. **Mettere in incubazione per 90 min \pm 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. Distribuire secondo il piano di distribuzione stabilito 1,2 mL di coniugato anti-IgG (R3) o 1,2 mL di coniugato anti-IgM (R4) in ciascun dei pozzetti corrispondenti. 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.

- È essenziale fermare contemporaneamente la rivelazione di 2 strisce della stessa coppia per una stessa sottoclasse di anticorpi ma è possibile interrompere indipendentemente quella di IgG o IgM (IgM, in concentrazioni più basse, si rivelano solitamente più lentamente rispetto agli IgG).
- Il siero del bambino è generalmente meno carico di IgM. Sarà necessario lasciare il tempo affinché la reazione si riveli correttamente, senza aver paura di vedere la striscia materna degli IgM che si oscura un po' di più.
- L'umore acqueo è solitamente meno carico di anticorpi. Sarà necessario lasciare il tempo affinché la reazione si riveli correttamente, senza aver paura di vedere le strisce sieriche che si oscurano un po' di più.

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. Posizionamento per la lettura: Trasferire le strisce su un foglio di carta, che servirà per archivarle. Posizionare le strisce con precisione, utilizzando il tratto di posizionamento. Per farlo, tieni le strisce in posizione con il righello piatto e attaccale insieme in cima con il nastro adesivo trasparente.

Appaiare una con l'altra le strisce IgG e IgM di ogni coppia di campioni in ordine numerico crescente, in base al piano di distribuzione stabilito (punto 1).

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).

CONTROLLO QUALITÀ E INTERPRETAZIONE

Descrizione bande

Un campione positivo può presentare molte bande situate tra 15 e 200 kDa. Soltanto le bande con peso molecolare inferiore a 120 kDa possono essere utilizzate per il confronto dei profili.

CIP WB G+M (toxoplasmosi congenita)

- Alla nascita (coppie madre/bambino):
Confrontare indipendentemente le strisce IgG e le strisce IgM. Leggere le 2 strisce contigue

contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nel sangue del cordone **e assente** nel siero materno.

Ogni banda con risoluzione ben definita, peso molecolare (PM) inferiore a 120 kDa e *presente solo nel bambino*, dimostra la sintesi da parte del bambino di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi congenita.

- Durante il follow-up post-natale (coppie Bambino G0 / Bambino G+N):

Confrontare indipendentemente le strisce IgG e le strisce IgM. Leggere le 2 strisce contigue contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nel siero a G+N **e assente** nel sangue del cordone.

Ogni banda con risoluzione ben definita, PM < 120 kDa e *presente solo a G+N*, dimostra la sintesi da parte del bambino di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi congenita.

Nota Bene: l'indicazione di CIP-WB IgG / IgM nel follow post-natale è volutamente limitata a 3 mesi nel test IgG e a 1 mese nell'IgM.

Osservazioni: La giustapposizione degli standard dei pesi molecolari colorati (busta R1) permette di stimare il PM delle bande antigeniche rivelate (occorre prima tagliarla con un righello e un bisturi come con una striscia di normale, manipolando con una pinzetta).

A - CIP NEGATIVO
(bambino non infetto)

B - CIP POSITIVO
(bambino infetto)

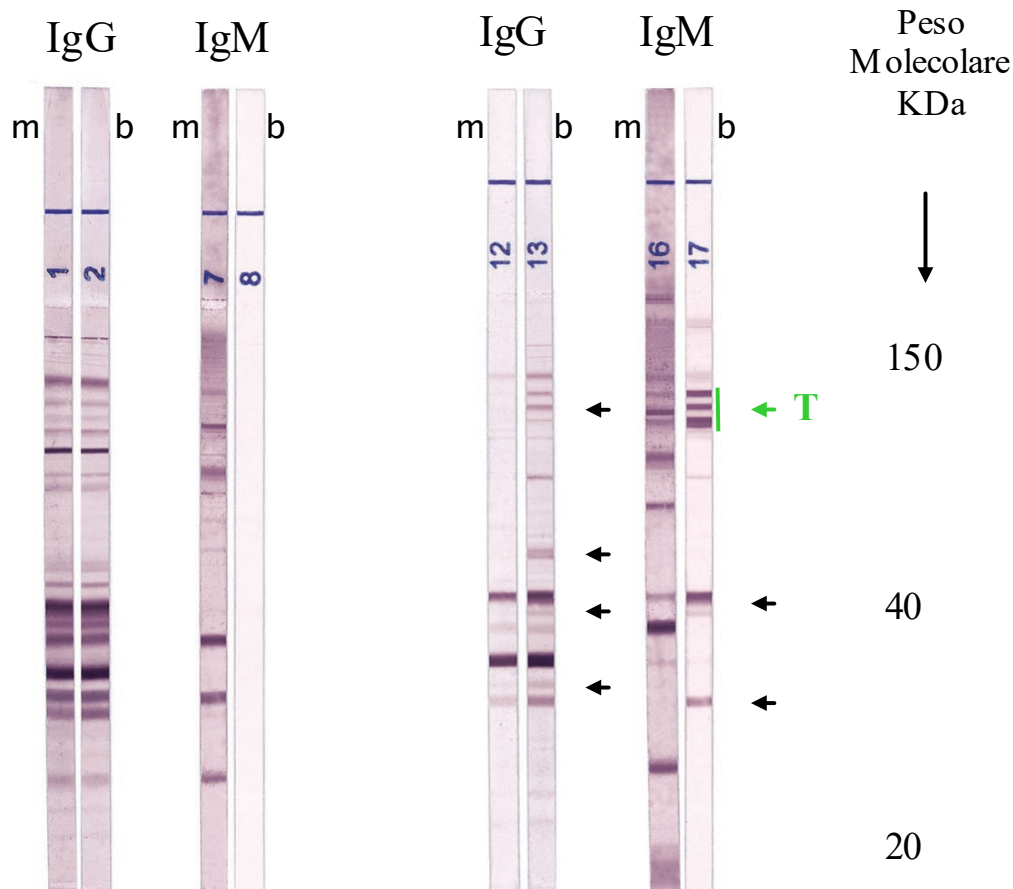


Fig. 1: toxoplasmosi congenita - Esempi di risultato positivo e negativo (m=madre; b=bambino)

I profili sono forniti a titolo di esempio. **Le strisce sono contrassegnate dalla lettera "A" specifica per il parametro del lotto "00011".**

La coppia madre-bambino (A) corrisponde a una madre infetta durante la gravidanza, ma il cui bambino è indenne: I profili IgG sono strettamente identici (IgG trasmessi); non ci sono ulteriori bande presenti sulle strisce IgG e/o IgM del bambino: **IL CIP-WB È NEGATIVO.**

La coppia (B) toxoplasmosi congenita, corrisponde ad una madre infetta durante la gravidanza, il cui figlio è stato egualmente infettato. In aggiunta agli anticorpi trasmessi, notiamo perfettamente sulle strisce del bambino la presenza di bande supplementari (←), in IgG e/o in IgM, corrispondenti agli anticorpi neo-sintetizzati dal bambino: **IL CIP-WB È POSITIVO.**

CIP WB IgG (toxoplasmosi oculare)

Leggere le 2 strisce contigue contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nell'umore acqueo **e assente** nel siero.

Ogni banda con risoluzione ben definita, peso molecolare (PM) inferiore a 120 kDa e *presente solo nell'umore acqueo*, dimostra la sintesi locale di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi oculare.

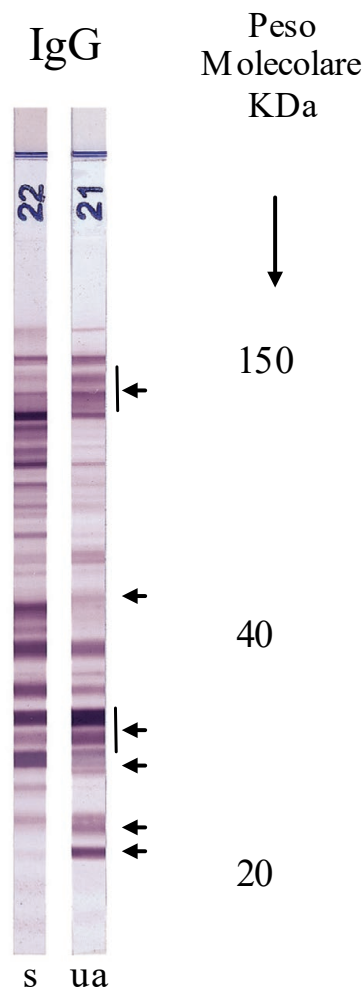


Fig. 2: toxoplasmosi oculare - Esempio di risultato positivo – (S= siero; ua = umore acqueo)

I profili sono forniti a titolo di esempio. **Le strisce sono contrassegnate dalla lettera "A" specifica per il parametro del lotto "00011".**

Osservazioni molto importanti

1. I risultati del CIP-WB IgG/IgM devono essere interpretati alla luce di altre informazioni cliniche, sierologiche, parassitologiche, epidemiologiche, imaging medicale, per stabilire la diagnosi della toxoplasmosi congenita o oculare.
2. Un risultato CIP-WB IgG/IgM negativo non esclude la diagnosi di toxoplasmosi congenita o oculare. Questi pazienti devono necessariamente essere seguiti nel tempo fino a quando la diagnosi di toxoplasmosi può essere confermata definitivamente o respinta.
3. Le fasce possono un aspetto molto variabile: sottili, spesse, più o meno colorate, intense...
Nel destreggiare questa tecnica si raccomanda di fare qualche confronto sui profili di coppie di campioni noti per prendere confidenza con la loro lettura.
Si raccomanda inoltre che la lettura del CIP-WB venga all'inizio eseguita in modo indipendente da due persone in laboratorio. In caso di discrepanza di interpretazione dovrà essere eseguito un CIP-WB di controllo.
4. Le frazioni antigeniche di altissimo peso molecolare (PM) sono molto ristrette sulla parte alta della striscia in favore di una migliore risoluzione di frazioni di PM medio e basso. Le bande con PM > 120kDa non possono pertanto essere utilizzate per l'interpretazione della prova: i campioni che presentano soltanto tali profili differenti non possono essere resi positivi.
5. Per contro (toxoplasmosi congenita), un "tripletta" (tre fasce facilmente riconoscibili) compreso tra 75 e 100 kDa si trova spesso sui positivi CIP WB IgM (vedi "T" Fig. 1 striscia n. 17 a destra).
6. Alla nascita (toxoplasmosi congenita), si dovrebbe diffidare in particolare di ogni rafforzamento generale di intensità delle bande (emoconcentrazione) in quanto potrebbe far credere alla presenza di bande aggiuntive nel sangue del cordone ombelicale. I sieri che presentano unicamente tali differenze di profilo sono resi negativi.
7. Per contro (toxoplasmosi congenita, toxoplasmosi oculare) il rafforzamento significativo (spesso in larghezza e intensità) di uno o due bande isolate mentre tutte le altre bande hanno intensità identica o minore, viene considerato come criterio di positività.
8. Anticorpi naturali (toxoplasmosi congenita):
La tecnica di immunoblotting è estremamente sensibile e l'antigene utilizzato per il test CIP-WB è stato selezionato per la molteplicità di bande antigeniche presenti sulla striscia.
Molte pubblicazioni si riferiscono a bande rivelate da immunoblotting in persone che apparentemente non hanno mai contratto la toxoplasmosi. Questi anticorpi (IgG e IgM) sono raramente rilevati da altre tecniche, ma lo sono molto frequentemente da immunoblotting. Sarebbero dovuti a reazioni incrociate con anticorpi diretti contro gli immunogeni di natura ancora indeterminata.
Questo è il motivo per cui l'indicazione del test **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** è riservata al confronto dei profili. (Per la conferma delle sierologie IgG, utilizzare solo il test **LDBIO TOXO II IgG** che è specifico e progettato per questo scopo).
I neonati non hanno anticorpi naturali (diversi dagli anticorpi materni trasmessi), ma la probabilità di comparsa di anticorpi naturali aumenta con l'età del lattante dopo 3 mesi; si trovano solo raramente tra 3 e 6 mesi.
Questo è il motivo per cui l'indicazione del test CIP-WB IgG/IgM nel follow-up post-natale è volutamente limitata a 3 mesi in IgG e a 1 mese in IgM: la presenza di bande non specifiche è infatti più precoce in IgM.
9. "Heat shock protein" (toxoplasmosi congenita):
Una striscia sottile non specifica, di intensità debole ma variabile, può essere presente in IgM all'altezza di 37kDa. Si tratta di un artefatto legato alla preparazione dell'antigene e chiamato "Heat Shock Protein". Presente a volte sia sulle due strisce della coppia madre-figlio, può tuttavia comparire più pronunciato con alcuni sieri nel follow-up del bambino. Non tenere conto di questa banda.
10. CIP-WB (toxoplasmosi oculare): Il CIP-WB IgM non presenta alcuna utilità nella diagnosi della toxoplasmosi oculare. D'altro canto, il CIP-IgA è di interesse diagnostico. Per ulteriori informazioni sul CIP-IgA, contattateci.

LIMITAZIONE D'USO

- La diagnosi di una malattia infettiva non può essere stabilita sulla base di un singolo risultato del test.
- I risultati sierologici devono essere interpretati in base alle informazioni disponibili (ad es. Epidemiologia, clinica, imaging, biologia ...) al fine di stabilire una diagnosi. Non dovrebbero essere utilizzati come base per la diagnosi sulla base della loro sola positività.

PRESTAZIONI (vedi bibliografia P.11)

Questi studi sono stati condotti da laboratori di riferimento indipendenti

CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSI CONGENITA alla nascita (Madre/Bambino)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DATI CLINICI	TC POS n = 54	41	13
	TC NEG n = 60	0	60

Tabella. 1: Prestazioni di CIP-WB IgG/IgM alla nascita (n = 114):

Specificità = 100%

Sensibilità = 76%

Valore predittivo positivo = 100%

Valore predittivo negativo = 83%

CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSI CONGENITA follow-up post-natale (Bambini G0/G20)

Tra i 54 bambini precedentemente testati al G0 (**Tabella. 1**), 10 bambini sani e 12 bambini infettati (n = 22) sono stati monitorati e analizzati al G20 in modo retrospettivo con il test **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **A G0:** 4 bambini tra i 12 bambini infetti non hanno mostrato un profilo diverso alla nascita (falsi negativi).
- **A G20:** Solo 1 rimane negativo.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
ATI CLINICI	TC POS n = 12	11	1
	TC NEG n = 10	0	10

Tabella 2: performance di CIP-WB IgG/IgM a G20 (n = 22)

Specificità = 100%

Sensibilità = 92%

Valore predittivo positivo = 100%

Valore predittivo negativo = 91%

CIP-WB IgG: TOXOPLASMOSI OCULARE (siero/umore acqueo)

I risultati illustrati in basso provengono dalla meta-analisi di quattro studi pubblicati dai centri di riferimento.

Questi studi confrontano i risultati di CIP-WB **IgG** a quelli del coefficiente di Goldmann Witmer (GWC) e a quelli della PCR. Essi illustrano anche i risultati diagnostici ottenuti dall'associazione combinata di due o tre di queste tecniche.

Questi quattro studi si sono serviti tutti del test di LDBIO, seguendo le raccomandazioni contenute nelle istruzioni per l'uso del kit.

La sensibilità è stata stabilita su 113 pazienti che presentavano toxoplasmosi oculare clinicamente provata. La specificità è stata calcolata su una popolazione di controllo che presentava una patologia oculare diversa dall'infezione della toxoplasmosi: toxocariasi oculare (n=5), infezione virale (n=10), altre infezioni (n=4), patologie oculari non infettive (n=126) tra cui cataratta (n=42).

Sensibilità (Se)

La sensibilità complessiva di CIP-WB IgG è del **62,8%** (n=113), risultato paragonabile al GWC (Se=61,0%, n=113) e superiore alla PCR (Se=43,5%, n=92, p=0,0028).

La combinazione di CIP-WB con GWC e PCR migliora la sensibilità della diagnosi:

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

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

Specificità (Sp)

La specificità complessiva di CIP-WB IgG è del **92,8%** (n=111), risultato paragonabile al GWC (Sp=94,2%, n=139) e inferiore alla PCR (Sp=100%, n=131, p=0,0009).

La combinazione delle due tecniche CIP-WB IgG + GWC, riduce leggermente la specificità della diagnosi (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). La combinazione con PCR non influenza la specificità.

Conclusione

Il test immunologico **Toxoplasma WB IgG IgM** ha prestazioni eccellenti nella diagnosi della toxoplasmosi congenita o oculare.

Nella toxoplasmosi congenita, il CIP-WB G + M ha una sensibilità del **76%** [95 CI 62-86%] e una specificità del **100%** [95 CI 92-100%] alla nascita. Il nuovo test nel primo mese di vita aumenta ulteriormente la sensibilità del CIP-WB G + M.

Nella toxoplasmosi oculare, CIP-WB IgG ha una sensibilità del **62,8%** [95 CI 53,2-71,6%] e una specificità del **92,8%** [95 CI 85,9-96,6%]. La combinazione con altre tecniche (GWC e / o PCR) aumenta le prestazioni diagnostiche.

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

- 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-Gagneux, 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-Gagneux, F. & Darde, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 264–296 (2012).
- Runday, 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).

NOTIFICA DI AGGIORNAMENTO: leggere attentamente

DATA DI RILASCIO	VERSIONE	RIEPILOGO DELLE MODIFICHE
26/07/2021	Vs 18	Rimozione dell'avviso di sicurezza R5 - Indirizzo e-mail di contatto – NaN3 EUH 032.
29/07/2022	Vs 19	R6 senza NaN3. Striscia identificata con la lettera A. Possibile utilizzo di reagenti provenienti da lotti diversi.
30/11/2022	Vs20	Nuovo indirizzo



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