

# TOXOPLASMA

CE0459



## Western Blot IgG IgM

Diagnostyka *in vitro* Test immunoblotu  
Technika półautomatyczna / ręczna

#TOP-WB24GM: 24 tests

#TOP-WB12GM: 12 tests

#TOP-WB96GM: 96 tests

## INSTRUKCJA UŻYCIA

Więcej informacji i instrukcje użytkowania w swoim języku można znaleźć na naszej stronie internetowej [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## PRZEZNACZENIE

**TOXOPLASMA Western Blot (WB) IgG IgM** to test jednorazowego użytku immunoblot do porównywania profili immunologicznych (Comparison of Immunologic Profiles, CIP-WB) do oznaczania IgG i IgM, który jest przeznaczony do diagnostyki:

- Wrodzona toksoplazmoza w dniu narodzin (D0): CIP-WB G+M pomiędzy krwią matki a krwią pępowinową.
- Wrodzona toksoplazmoza w monitoringu po narodzinach (D+N): CIP-WB G+M pomiędzy krwią pępowinową w D0 a krwią dziecka w D+N.
- Toksoplazmoza oczna: CIP-WB IgG pomiędzy surowicą pacjenta a cieczą wodnistą.

Ten test nie służy do wykonywania badań przesiewowych ani do potwierdzania osobnych serologii. W przypadku takich zastosowań należy korzystać z testu test **LDBIO TOXO II IgG** (ref. TOXO II IgG WB).

## ZASADA DZIAŁANIA TESTU

### Technika Western Blot

Antygeny *Toxoplasma gondii*, po ich oddzieleniu za pomocą elektroforezy, zostają związane poprzez electroblotting z powierzchnią membrany nitrocelulozowej (jest to tzw. transfer) podzielonej na 24 paski ponumerowane od 1 do 24.

### Wykonanie testu

*Uwaga:* Testy Immunoblot IgG lub IgM opisane poniżej są prowadzone jednocześnie podczas manipulacji.

### Test Immunoblot IgG

Test obejmuje osobną inkubację, **przy zastosowaniu 2 sąsiadujących ze sobą pasków z tego samego transferu**, dwóch próbek (surowicy lub cieczy wodnistej), których profile immunologiczne mają zostać porównane.

- Krok 1: Każdą próbkę surowicy (lub cieczy wodnistej) przeznaczoną do testu inkubuje się osobno za pomocą paska. Przeciwciała przeciwko *Toxoplasma* potencjalnie obecne w próbce wiążą się selektywnie z antygenami *T. gondii*.
- Krok 2: Następnie koniugat fosfatazy alkalicznej i **przeciwciała przeciwludzkiego IgG** wiąże się ze związanymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko przeciwciałom.
- Krok 3: Immunokompleksy reagują z substratem. Antygeny rozpoznane przez przeciwciała skierowane przeciwko *Toxoplasma* **klasy IgG** obecne w próbkach są widoczne jako fioletowe, poprzeczne pasma.

### Test Immunoblot IgM

Zasada działania testu jest taka sama, lecz w kroku 2 poprzedni koniugat zostaje zastąpiony koniugatem fosfatazy alkalicznej i **przeciwciała przeciwludzkiego IgM**. Rozwój koloru wskaże więc antygenowe pasma rozpoznane przez antygenowe przeciwciała *Toxoplasma* **klasy IgM** obecne w próbkach.

### Odczyt

Porównanie pasków IgG a następnie IgM (lub IgA) umożliwi wykazanie potencjalnej obecności pasm, które rozwijają się wyłącznie w obecności jednej z próbek a nie tej drugiej (patrz punkt Interpretacja).

## ZAWARTE ODCZYNNIKI

Domyślnie: pakiet 24 testów (#TOP-WB24GM)

*kursywa*: pakiet 12 testów (#TOP-WB12GM) – **Tłusty druk**: Pakiet 96 testów (#TOP-WB96GM).

ID	Ilość	Opis	Skład
R1	1	Pakiet(y) 24 (12, <b>4x24</b> ) PASKÓW: wstępnie przycięte + kolorowe wzorce. (Każdy pakiet i każdy transfer jest oznaczony niepowtarzalnym numerem seryjnym)	Uwrażliwiona nitroceluloza Oznaczona kolorami masa cząsteczkowa (kDa): Niebieski: 250, Niebieski: 150, Niebieski: 100, Różowy: 75, Niebieski: 50, Zielony: 37, Różowy: 25, Niebieski: 20, Niebieski: 15.
R2	1	Fiolka 30 (30, <b>125</b> ) ml ROZTWORU BUFOROWEGO (Gotowy do użycia - różowy roztwór).	Roztwór buforowy + środek powierzchniowo czynny.
R3	1	Fiolka zawierająca 30 (30, <b>60</b> ) ml KONIUGATU ANTY IgG (Gotowy do użycia - niebieski roztwór).	Roztwór buforowy + poliklonalna surowica z kozim przeciwludzkim IgG skoniugowana z fosfatazą alkaliczną + NaN <sub>3</sub> (<0,1%) + stabilizatory.
R4	1	Fiolka zawierająca 30 (30, <b>60</b> ) ml KONIUGATU ANTY IgM (Gotowy do użycia - żółty roztwór).	Roztwór + poliklonalna surowica z kozim przeciwludzkim IgM skoniugowana z fosfatazą alkaliczną + NaN <sub>3</sub> (< 0.1%) + stabilizatory.
R5	1	Fiolka 30 (30, <b>125</b> ) mL SUBSTRATU (Gotowy do użycia - nieprzeźroczysta brązowa fiolka).	Roztwór buforowy + NBT + BCIP + stabilizatory.
R6	1	Fiolka 60 (60, <b>250</b> ) mL KONCENTRATU DO PRZEMYWANIA 10X ROZTWÓR BUFOROWY ( <u>Do 10-krotnego rozcieńczenia</u> w wodzie destylowanej - bezbarwny roztwór).	Roztwór buforowy + środek powierzchniowo czynny.

**R1:** Litera przed każdym numerem paska jest specyficzna dla parametru.

**R2, R3, R4, R5 i R6** są wspólne dla wszystkich zestawów i mają niepowtarzalny numer partii uzależniony wyłącznie od daty produkcji. **Zaleca się przeprowadzenie testów wieloparametrowych (patrz przedział Immunoblot LDBIO) w celu ograniczenia liczby otwartych fiolek i zapewnienia lepszej kontroli jakości.**

R3, R4 (NaN<sub>3</sub>): EUH 032 - W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

EUH 210 Karta charakterystyki dostępna na żądanie i na naszej stronie internetowej [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com).

### DODATKOWE WYMAGANE MATERIAŁY NIE ZOSTANĄ ZAPEWNIONE

- Wielokanałowe, polipropylenowe kuwety inkubacyjne do prowadzenia testów typu mini-blot (nr WBPP- 08 lub równoważny).
- Platforma kołysząca do testów Immunoblot, system próżniowy do płynów (wanienki WBPP- 08, które dostarczamy mogą zostać opróżnione poprzez obrócenie).
- Probówki i materiały do pobierania próbek, kolby z podziałką, specjalne pojemniki. Automatyczne pipety, mikropipety i końcówki jednorazowego użytku (o objętości 10 µL, 25 µL, 1,2 mL i 2 mL).
- Woda destylowana lub dejonizowana. Papier absorpcyjny (np. bibuła Whatman), przeźroczysta taśma klejąca.
- Rękawiczki, pinceta do przenoszenia pasków, obcinak lub skalpel, płaska przeźroczysta linijka.

**Uwaga:** Nasze odczynniki mogą być wykorzystywane w automatycznym analizatorze Immunoblot. **Należy zachować ostrożność w celu uniknięcia możliwego skażenia chemicznego naszych odczynników, jeśli w analizatorze stosowane są również odczynniki innego producenta** (znany przykład: skażenie TWEEN 20), i skażenia bakteryjne. Zachować fiołki do analizatora. Po przetworzeniu nie wlewać pozostałości użytych odczynników z powrotem do oryginalnych fiolek.

## PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Przechowywać w temperaturze od 2 do 8 °C. Odczynniki z zestawu zachowują stabilność do daty ważności wskazanej na opakowaniu zewnętrznym i etykietach fiolek. Nie używać zanieczyszczonego lub mętnego odczynnika. Roztwór buforowy rozcieńczony do 1/10 zachowuje stabilność przez 2 miesiące w temp. +2 to +8 °C oraz przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej.

## ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE STOSOWANIA

### Bezpieczeństwo stosowania

- Wyłącznie do zastosowań *in vitro*. Tylko do użytku profesjonalnego. Tylko dla przeszkolonego technicznie personelu. Przestrzegać zasad Dobrej praktyki laboratoryjnej i traktować każdy odczynnik i każdą próbkę jako potencjalnie toksyczne i/lub zakaźne.
- Nosić kitel laboratoryjny, rękawice i okulary; nie pić, nie jeść i nie palić w laboratorium. Nie wkładać pipet do ust.
- Substrat zawiera mieszkankę NBT i BCIP, toksyczny w kontakcie (ze skórą i błoną śluzową) oraz przy wdychaniu.
- Odczynniki zawierają azydek sodu, który może tworzyć wybuchowe sole metaliczne z ołowiem i miedzią. Wszelkie rozlane odczynniki spłukać wodą.
- Utylizacja odpadów (próbki, końcówki, płyn do przemywania, zużyty odczynnik...) zgodnie z dobrą praktyką stosowaną w branży i przepisami obowiązującymi w danym kraju.
- Każdy poważny incydent musi być przedmiotem deklaracji skierowanej do producenta i właściwego organu.

### Środki ostrożności

- Przeczytaj i zinterpretuj wyniki w bezpośrednim świetle białym.
- Zaleca się stosowanie wszystkich odczynników z tej samej partii. Jeśli używane są różne partie, należy zapewnić możliwość śledzenia ich losów.
- Paski wykorzystywać w porządku numerycznym. Nie łączyć pasków o różnych numerach seryjnych, transfery należy stosować kolejno. Przed rozpoczęciem testu należy ustalić specjalny plan dystrybucji.
- Nie dotykać pasków placami, korzystać z pincety.
- Odczynniki należy dobrze wymieszać przed użyciem, w szczególności skoncentrowany roztwór buforowy do przemywania.
- Zamknąć fiołki po użyciu, nie używać, jeśli do odczynników wprowadzono przypadkiem inną substancję. Nie używać odczynnika z fiołki noszącej oznaki wycieku. Nie używać roztworu mętnego lub ze strątem.
- Stosować wyłącznie końcówki pipety przeznaczone do jednorazowego użytku. Unikać skażenia pomiędzy poszczególnymi kanałami. Obserwować końcówki pod kątem tworzenia się piany i pęcherzyków powietrza w ich wnętrzu (skażenie bakteryjne fiolek z odczynnikami).
- Kuwety inkubacyjne czyścić wodą destylowaną (w żadnym przypadku nie stosować detergentów ani wybielacza).
- Pomińcie próbki lub dystrybucja nieprawidłowej objętości może spowodować uzyskanie negatywnym lub pozytywnym wynikiem testu, niezależnie od rzeczywistego stanu.

## POBIERANIE PRÓBEK

Aseptycznie pobrać próbki do suchych próbek. Wymagane jest co najmniej 35 µl surowicy lub 10 µl cieczy wodnistej. W przypadku cieczy wodnistej zastosowanie 25 µl zwiększy czułość testu (Partz § Procedura Prowadzenia Testu).

Próbki należy utrzymywać w temperaturze 2-8 °C do czasu ich przetwarzania. Jeżeli próbki mają być przechowywane dłużej niż tydzień, należy je zamrozić w temperaturze -20 ± 5 °C. Nie używać skażonych próbek. Unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania próbek.

Nawet jeśli nie zaobserwuje się szczególnych reakcji krzyżowych w zhemolizowanych, ikteryicznych lub

lipemicznych próbkach surowicy, zaleca się ostrożną interpretację wyników uzyskanych z takich próbek.

## PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

**Roztwór buforowy do przemywania:** Do 4 testów, w czystej butelce, rozcieńczyć 10 mL koncentratu do przemywania 10X (R6) w 90 mL wody destylowanej lub dejonizowanej. Uważaj, aby dobrze wymieszać rozcieńczony bufor.

## PROCEDURA PROWADZENIA TESTU

*Proszę zauważyć:* Zaleca się przeprowadzenie testów wieloparametrowych (patrz przedział Immunoblot LDBIO) w celu ograniczenia liczby otwartych fiolek i zapewnienia lepszej kontroli jakości.

1. Przygotować plan dystrybucji próbek.

**Ściśle wymagane jest porównanie pary próbek z połączonymi paskami (sąsiadujące numery) z danego transferu (ten sam numer seryjny).** Porównywania pasków znajdujących się od siebie w dużej odległości (np. nr 2 z nr 15) nie jest wiarygodne. **Niebezpieczne jest** (fałszywe wyniki) porównywanie pasków z różnych zestawów (paski o różnych numerach seryjnych).

2. Pociąć odpowiednią ilość pasków (R1) za pomocą skalpela i czystej, płaskiej, przezroczystej linijki, utrzymując niebieską linię pozycjonującą na paskach: mocno przytrzymać paski w miejscu za pomocą linijki i ciąć je obok szczepu (numery są widoczne przez linijkę).
3. Wprowadzić 1,2 ml roztworu buforowego (R2) do każdego kanału zgodnie z ustalonym planem.
4. Umieścić ponumerowane paski w kanałach w porządku numerycznym. Należy odczekać, aby paski się ponownie nawodniły na powierzchni przez ok. 1 minutę, tak aby numer był widoczny na górze, NASTĘPNIE delikatnie potrząsnąć kuwetą, aby całkowicie zanurzyć je w roztworze buforowym.
5. Próbkę należy rozdzielić zgodnie z ustalonym planem dystrybucji (krok 1) i przy zastosowaniu następujących objętości:

	Surowica	Ciecz wodnista
IgG	10 µl	10 lub 25 µl
IgM	25 µl	-

W przypadku cieczy wodnistej zastosowanie 25 µl zwiększy czułość testu.

Delikatnie potrząsnąć kuwetą po każdym nałożeniu. Umieścić kuwetę na platformie kołyszącej. **Inkubować przez 90 min ± 5 min w temp. 20-26 °C.**

6. Krok przemywania: Opróżnić kanały za pomocą pipety Pasteura lub poprzez odwrócenie kuwety inkubacyjnej. Nałożyć 2 do 3 ml rozcieńzonego roztworu buforowego do przemywania do każdego kanału. Inkubować na platformie kołyszącej przez 3 min. Powtórzyć dwukrotnie, następnie opróżnić zawartość kanałów. Zwrócić uwagę na to, aby paski nie odwróciły się podczas tych kroków.
7. Rozdzielać zgodnie z ustalonym planem dystrybucji, 1,2 ml koniugatu anti-IgG (R3) lub 1,2 ml koniugatu anti-IgM (R4) w każdym z odpowiednich dołków. Umieścić kuwetę na platformie kołyszącej. **Inkubować przez 60 min ± 5 min w temp. 20-26 °C.**
8. Step przemywania: powtórzyć krok 6.
9. Nałożyć 1,2 ml substratu NBT/BCIP (R5) do każdego kanału. Umieścić na platformie kołyszącej i chronić przed bezpośrednim światłem **Inkubować przez 60 min ± 5 min w temp. 20-26 °C.**

Bez względu na parametr monitorować rozwój koloru. Rozwój można zatrzymać, jeśli kolor w tle paska ciemnieje do punktu, w którym odczyt jest utrudniony (jakość kroków przemywania ma istotny wpływ na kolor w tle). Proszę pamiętać, że paski będą jaśnieć w miarę wysychania.

- Podklasy przeciwciał, lecz można niezależnie zatrzymać rozwój koloru IgG lub IgM (IgM, w niższym stężeniu, zazwyczaj rozwijają się wolniej niż IgG).
- W surowicy dzieci stężenie IgM jest na ogół niższe. Prawidłowy rozwój reakcji wymaga czasu i nie należy się niepokoić, jeśli paski z IgM matki ściemniają nieco bardziej.
- W cieczy wodnistej stężenie przeciwciał jest na ogół niższe. Prawidłowy rozwój reakcji wymaga czasu i nie należy się niepokoić, jeśli paski z surowicą ściemniają nieco bardziej.

10. Zatrzymać reakcję poprzez zassanie substratu za pomocą pipety Pasteura lub poprzez odwrócenie kuwety inkubacyjnej i nałożenie 2 ml wody destylowanej do kanałów. Jeszcze raz powtórzyć ostatni krok przemywania.

11. Suszenie pasków: Kiedy kanały będą nadal wypełnione wodą, chwycić paski pincetą za nienumerowany koniec i położyć ja na papierze absorpcyjnym Whatmana, tak aby numer był widoczny. Pozostawić do wyschnięcia. Kolor pasków zrobi się naturalnie jaśniejszy podczas suszenia. Interpretację można przeprowadzić dopiero po zakończeniu suszenia.

12. Przechowywanie: Przenieść paski na arkusz papieru, który zostanie użyty do ich archiwizacji. Ostrożnie wyrównaj paski z niebieską linią pozycjonowania. Przytrzymać je w miejscu za pomocą płaskiej linijki i przykleić górną część pasków przezrystą taśmą samoprzylepną.

Zestawić, obok siebie, paski IgG i IgM każdej pary próbek, rosnąco, zgodnie z ustalonym planem dystrybucji (krok 1).

**Ściśle wymagane jest porównanie pary próbek z połączonymi paskami (sąsiadujące numery) z danego transferu (ten sam numer seryjny).** Porównywania pasków znajdujących się od siebie w dużej odległości (np. nr 2 z nr 15) nie jest wiarygodne. **Niebezpieczne jest** (falszywe wyniki) porównywanie pasków z różnych zestawów (paski o różnych numerach seryjnych).

## KONTROLA JAKOŚCI I INTERPRETACJA

### Opis pasm

Próbka dodatnia może wykazywać znaczną liczbę pasm mieszczących się pomiędzy 15 a 200 kDa. Tylko pasma o masie cząsteczkowej poniżej 120 kDa mogą zostać wykorzystane do porównania profili.

### Interpretacja

#### CIP WB G+M (toksoplazmoza wrodzona)

- W dniu narodzin (pary matka/dziecko):

Przeprowadzić niezależne porównanie pasków IgG i IgM. Jednocześnie odczytać 2 sąsiadujące ze sobą paski od góry do dołu, zwracając jednocześnie uwagę na wszelkie pasma antygenowe **obecne** w krwi pępowinowej i **nieobecne** w surowicy matki.

Wszelkie pasma o wyraźnej rozdzielczości, masie cząsteczkowej (MW) poniżej 120 kDa i które są *obecne tylko u dziecka* stanowią dowód na to, że u dziecka doszło do syntezy przeciwciał skierowanych przeciwko Toxoplasma, co sugeruje wrodzoną toksoplazmozę.

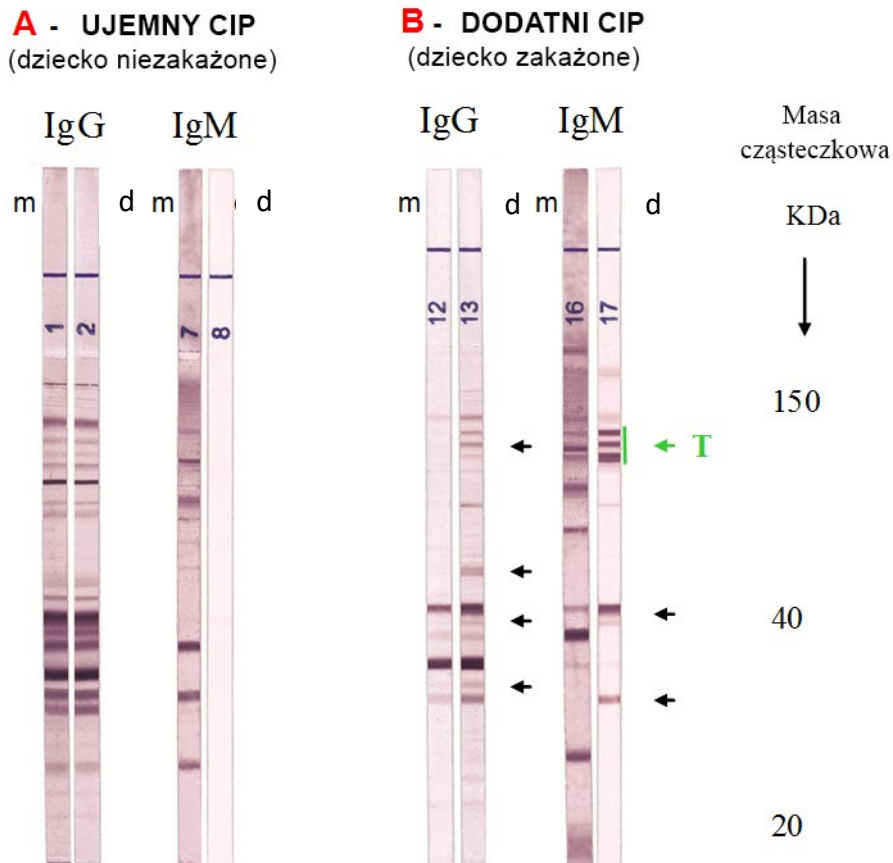
- W okresie obserwacji kontrolnej po narodzinach (pary dziecko D0/dziecko D+N):

Przeprowadzić niezależne porównanie pasków IgG i IgM. Jednocześnie odczytać 2 sąsiadujące ze sobą paski od góry do dołu, zwracając jednocześnie uwagę na wszelkie pasma antygenowe **obecne** w krwi surowicy w D+N i **nieobecne** w krwi pępowinowej.

Wszelkie pasma o wyraźnej rozdzielczości, MW < 120 kDa i które są *obecne tylko w D+N* stanowią dowód na to, że u dziecka doszło do syntezy przeciwciał skierowanych przeciwko *Toxoplasma*, co sugeruje wrodzoną toksoplazmozę.

*Nota bene:* wskazanie CIP-WB IgG/IGM w obserwacji kontrolnej po narodzinach celowo ogranicza się do 3 miesięcy dla IgG i 1 miesiąca dla IgM.

Uwagi: Zestawienie barwionego wzorca masy cząsteczkowej (folder R1) umożliwia MW rozwiniętych pasm antygenowych do oszacowania (należy go wcześniej pociąć za pomocą linijki i skalpela, tak jak zwykły pasek i należy go przenosić za pomocą pincety).



**Rys. 1:** Wrodzona toksoplazmoza - Przykłady wyników dodatnich i ujemnych (m=matka; d=dziecko)

Profile są podane jako przykładowe. Paski oznaczone są literą "A" właściwą dla parametru z partii "00011".

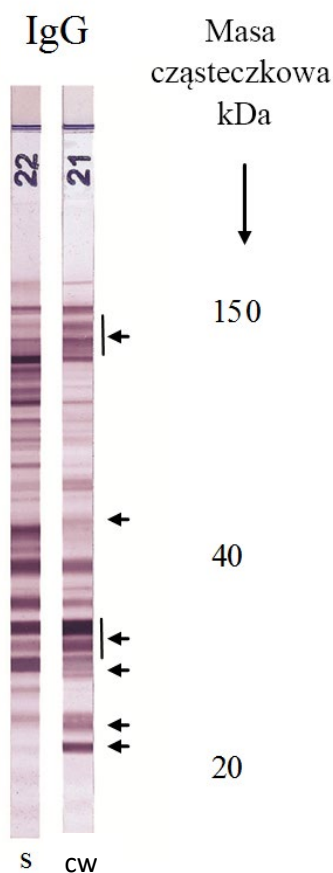
**Para matka-dziecko (A)** odpowiada matce zakażonej w trakcie trwania ciąży, której dziecko nie jest zakażone. Profile IgG są ściśle identyczne (przekazane IgG); na paskach IgG i/lub IgM dziecka nie ma dodatkowych pasm. **WYNIK CIP-WB JEST UJEMNY.**

**Para (B), wrodzona toksoplazmoza,** odpowiada zakażeniu matki w trakcie trwania ciąży, której dziecko jest również zakażone. Oprócz przekazanych przeciwciał, idealnie widać obecność dodatkowych pasm (←), dla IgG i/lub IgM, na paskach dziecka, co odpowiada przeciwciałom nowo zsyntetyzowanym przez dziecko: **WYNIK CIP-WB JEST DODATNI.**

### CIP WB IgG (toksoplazmoza oczna)

Jednocześnie odczytać 2 sąsiadujące ze sobą paski od góry do dołu, zwracając jednocześnie uwagę na wszelkie pasma antygenowe **obecne** w cieczy wodnistej i **nieobecne** w surowicy.

Wszelkie pasma o wyraźnej rozdzielczości, masie cząsteczkowej (MW) poniżej 120 kDa i które są *obecne tylko cieczy wodnistej* stanowią dowód na to, że u dziecka doszło do syntezy przeciwciał skierowanych przeciwko *Toxoplasma*, co sugeruje toksoplazmozę oczną.



**Rys. 2:** Toksoplazmoza oczna - Przykłady wyników dodatnich – (S= serum; cw cieczy wodnistej)

Profile są podane jako przykładowe. **Paski oznaczone są literą "A" właściwą dla parametru z partii "00011".**

### Najważniejsze kwestie

1. Wyniki CIP-WB IgG/IgM należy interpretować w świetle innych informacji z badań klinicznych, serologicznych, parazytologicznych, epidemiologicznych i obrazowych badań medycznych w celu ustalenia diagnozy toksoplazmozy wrodzonej lub ocznej.
2. Negatywny wynik CIP-WB IgG/IgM nie wyklucza diagnozy toksoplazmozy wrodzonej lub ocznej. Tych pacjentów należy zawsze monitorować w czasie do momentu ostatecznego potwierdzenia lub wykluczenia rozpoznania toksoplazmozy.
3. Mogą występować duże różnice pomiędzy różnymi aspektami pasm: wąskie, grube, bardziej lub mniej zabarwione, intensywne itp.  
W przypadku zastosowania tej techniki zaleca się przeprowadzenie kilku porównań profilu ze znanymi parami próbek, aby zaznajomić się ze sposobem ich odczytywania.  
Na początku zaleca się niezależne wykonanie odczytu CIP-WB przez dwie osoby w laboratorium. W przypadku niezgodnej interpretacji, należy przeprowadzić kontrolny test CIP-WB:
4. Frakcje antygenowe o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej (MW) znajdują się bardzo blisko siebie w górnej części paska na korzyść lepszej rozdzielczości frakcji o średniej i niskiej masie cząsteczkowej. Z tego względu pasm MW > 120 kDa nie można wykorzystać do interpretacji testu: próbki, które wykazują jedynie takie różnice w profilu nie mogą dać wyniku dodatniego.



5. Dla kontrastu (toksoplazmoza wrodzona), „trójka” (trzy bardzo łatwo rozpoznawalne pasma) znajdujące się pomiędzy 75 a 100 kDa bardzo często znajduje się na dodatnich CIP-WB IgM (patrz **“T” Rys. 1**, pasek nr 17 na prawo).
6. W przypadku badania dniu narodzin (toksoplazmoza wrodzona) należy zwracać szczególną uwagę na wzmocnienie intensywności pasm (hemokoncentracja), co może sugerować, że dodatkowe pasma istnieją w krwi pępowinowej. Próbkę surowicy o takich różnicach w profilu dają wynik ujemny.
7. Dla kontrastu (toksoplazmoza wrodzona, toksoplazmoza oczna), istotne wzmocnienie (często pod względem szerokości i intensywności) jednego lub dwóch izolowanych pasm, podczas gdy wszystkie pozostałe pasma mają taką samą lub słabszą intensywność, uznaje się za kryterium wyniku dodatniego.
8. Naturalne przeciwciała (toksoplazmoza wrodzona).  
Technika Immunoblot jest niezwykle czuła i antygen zastosowany w teście CIP-WB został wybrany dla różnych pasm antygenów obecnych na pasku.  
Liczne publikacje wymieniają pasma opracowane za pomocą techniki Immunoblot u osób, które najwyraźniej nigdy nie zostały zakażone toksoplazmą. Te przeciwciała (IgG i IgM) są bardzo rzadko wykrywane przez inne techniki, lecz bardzo często wykrywa je test Immunoblot. Może to wynikać z reakcji krzyżowych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko immunogenom, których natury jeszcze nie określono.  
To właśnie dlatego wskazania dla testu **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** są zastrzeżone do porównywania profili. (Aby potwierdzić serologię IgG, należy wykorzystać swoisty test **LDBIO TOXO II IgG**, który jest do tego przeznaczony)  
Noworodki nie wykazują naturalnych przeciwciał (innych niż przeciwciała przekazane przez matkę), lecz prawdopodobieństwo pojawienia się naturalnych przeciwciał wzrasta z wiekiem dziecka po 3 miesiącach, są one jednak rzadko stwierdzane pomiędzy 3 a 6 miesiącem życia.  
To dlatego wskazanie CIP-WB IgG/IGM w obserwacji kontrolnej po narodzinach celowo ogranicza się do 3 miesięcy dla IgG i 1 miesiąca dla IgM: nieswoiste pasma w rzeczywistości nie pojawiają się wcześniej dla IgM.
9. „Heat Shock Protein” (toksoplazmoza wrodzona):  
Nieswoiste, wąskie pasmo o słabej lecz zmiennej intensywności może być obecne dla IgM do 37 kDa. Jest to artefakt związany z preparatem antygeny i nazywany „Heat Shock Protein”. Obecny na obu paskach pary matka-dziecko może on niemniej jednak czasami wydawać się wyraźniejszy w pewnych próbkach surowicy w trakcie obserwacji kontrolnej dziecka. Nie należy uwzględniać tego pasma.
10. CIP-WB (toksoplazmoza oczna): Test CIP-WB IgM nie nadaje się do diagnozowania toksoplazmozy ocznej.  
Jednak CIP-IgA ma znaczenie diagnostyczne w tej sytuacji. Aby uzyskać więcej informacji na temat CIP-IgA, prosimy o kontakt.

## OGRANICZENIA ZASTOSOWANIA

- Diagnozy choroby zakaźnej nie można ustalić na podstawie jednego wyniku testu.
- Wyniki serologiczne należy interpretować zgodnie z dostępnymi informacjami (np. epidemiologiczne, kliniczne, obrazowe, biologiczne itp.) w celu ustalenia diagnozy. Nie powinny być one wykorzystywane jako podstawa do diagnozy tylko na podstawie ich pozytywnego wyniku.

## WYDAJNOŚĆ (patrz bibliografia S. 12)

Te badania zostały przeprowadzone przez niezależne laboratoria referencyjne.

### CIP-WB G+M: Wrodzona toksoplazmoza w dniu narodzin (matka/dziecko)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DANE KLINICZNE	POS CT n = 54	41	13
	NEG CT n = 60	0	60

**Tabela. 1:** Parametry testu CIP-WB IgG/IgM wykonywanego przy urodzeniu (n = 114)

**Swoistość = 100%**  
**Wartość predykcyjna dodatnia = 100%**

**Czułość = 76%**  
**Wartość predykcyjna ujemna = 83%**

#### CIP-WB G+M: WRODZONA TOKSOPLAZMOZA w obserwacji kontrolnej po narodzinach (dziecko D0/D20)

Z 54 dzieci przebadanych wcześniej w D0 (**Tabela 1**), 10 dzieci niezakażonych i 12 dzieci zakażonych (n = 22) było monitorowanych do D20 i uzyskane dane poddano analizie retrospektywnej za pomocą testu **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **W D0:** 4 z 12 zakażonych dzieci nie wykazało profilu różniącego się od urodzenia (fałszywe wyniki ujemne).
- **W D20:** U 1 dziecka wynik pozostaje ujemny.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DANE KLINICZNE	POS CT n = 12	11	1
	NEG CT n = 10	0	10

**Tabela 2:** Parametry testu CIP-WB IgG/IgM wykonywanego przy urodzeniu w D20 (n = 22)

**Swoistość = 100%**  
**Wartość predykcyjna dodatnia = 100%**

**Czułość = 92%**  
**Wartość predykcyjna ujemna = 91%**

#### CIP-WB IgG: TOKSOPLAZMOZA OCZNA (surowica/ciecz wodnista)

Parametry opublikowane poniżej pochodzą z metaanalizy czterech badań opublikowane według ośrodków odniesienia.

Te badania porównują parametry CIP-WB **IgG** ze współczynnikiem Goldmanna Witmera (GWC) i PCR. Pokazują one również parametry diagnostyczne uzyskane dzięki skojarzonemu zastosowaniu dwóch lub trzech z tych technik.

Wszystkie z tych czterech badania korzystały z testu LDBIO zgodnie z zalecaniami instrukcji użycia zestawu.

Czułość oznaczono na 113 pacjentach z klinicznie potwierdzoną toksoplazmozą oczną. Swoistość obliczono w populacji kontrolnej z chorobami oczu innymi niż zakażenie toksoplazmozą: toksokaroza oczna (n=5), infekcja wirusowa (n=10), inne infekcje (n=4), niezakaźne choroby oczu (n=126) w tym zaćma (n=42).

#### Czułość (Sensitivity, Se)

Ogólna czułość CIP-WB IgG wynosi **62,8%** (n=113), wartość tego parametru jest porównywalna z GWC (Se=61,0%, n=113) i wyższa niż PCR (Se=43,5%, n=92, p=0,0028).

Kombinacja CIP-WB z GWC i PCR poprawia czułość diagnozy:

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

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

#### Swoistość (Specificity, Sp)

Ogólna swoistość CIP-WB IgG wynosi **92,8%** (n=111), wartość tego parametru jest porównywalna z GWC (Sp=94,2%, n=139) i niższa niż PCR (Sp=100%, n=131, p=0,0009).

Kombinacja dwóch technik, CIP-WB IgG + GWC, nieco obniża swoistość diagnozy (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). Kombinacja z PCR nie ma wpływu na swoistość.

#### Wniosek

Test immunologiczny **Toxoplasma WB IgG IgM** ma doskonałe wyniki w diagnostyce wrodzonej lub ocznej toksoplazmozy.

W toksoplazmoziozie wrodzonej CIP-WB G + M ma czułość **76%** [95CI 62-86%] i swoistość **100%** [95CI 92-100%] przy urodzeniu. Ponowne testowanie w pierwszym miesiącu życia dodatkowo zwiększa czułość CIP-WB G + M.

W toksoplazmoziozie ocznej CIP-WB IgG ma czułość **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] i swoistość **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Połączenie z innymi technikami (GWC i / lub PCR) zwiększa wydajność diagnostyczną.

### Odtwarzalność

Przetestowano odtwarzalność pomiędzy seriami i partiami. W obu przypadkach korelacja surowicy do surowicy w odniesieniu do swoistych pasm jest doskonała.

### Interferencje

Nawet jeśli nie zaobserwuje się szczególnych reakcji krzyżowych w zhemolizowanych, ikteryicznych lub lipemicznych próbkach surowicy, zaleca się ostrożną interpretację wyników uzyskanych z takich próbek.

## ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

**„Pasma są blade z niewielkim kontrastem”**: Pewne próbki surowicy z niewielkim stężeniem przeciwciał mogą dawać takie wyniki.

**„Są widoczne obszary zaciemnione, mniej lub bardziej wybarwione, nieco rozproszone”**: Pasek nie był całkowicie zanurzony w jednym z odczynników i inkubacja nie przebiegła prawidłowo na całej długości paska. Plamy mogą być również obecne, jeśli próbka została umieszczona w kuwecie, która nie została odpowiednio wytrząśnięta po umieszczeniu w niej próbki.

**„Szum jest istotny i bardzo utrudnia odczyt”**: Przemycanie było niewystarczające lub ostatnia inkubacja trwała zbyt długo. Zapewnić dobre techniki testowania, przestrzegać czasów przemycania i zapewnić odpowiednią jakość wody. Skrócić czas ostatniej inkubacji. W wyjątkowych sytuacjach, pewne próbki surowicy mogą reagować w sposób nieswoisty. W takiej sytuacji wyniku testu Immunoblot nie można wykorzystać.

Nieswoisty szum może występować tylko na fragmencie paska, uniemożliwiając interpretację wyników tylko dla tego fragmentu.

**„W roztworze pojawia się strąk podczas ostatniego kroku rozwoju”**: substrat może rzeczywiście ulec wytrąceniu (czarne płatki) w roztworze buforowym pod koniec rozwoju. To zjawisko nie wpływa na jakość rozwoju. To zjawisko nie wpływa na jakość rozwoju, który należy kontynuować normalnie. Ostatnie przemycanie wodą destylowaną eliminuje obecność cząstek stałych.

## 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).

**POWIADOMIENIE O AKTUALIZACJI - przeczytaj uważnie**

DATA WYDANIA	WERSJA	PODSUMOWANIE MODYFIKACJI
26/07/2021	Vs 18	Usunięcie ostrzeżenia dotyczącego bezpieczeństwa R5 - Kontaktowy adres e-mail – NaN3 EUH 032.
29/07/2022	Vs 19	R6 bez NaN3. Pasek oznaczony literą A. Możliwe użycie odczynników z różnych partii
30/11/2022	Vs20	Nowy adres



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](mailto:info@ldbiodiag.com)