

**LDBIO TOXO II IgM** CE0459



## CONFIRMATION

Diagnóstico *in vitro* Ensaio Immunoblot  
Técnica manual / semi-automática

#T2M-24M: 24 testes

#T2M-12M: 12 testes

#T2M-96M: 96 testes

# INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Encontre mais informações e instruções de uso no seu idioma no nosso site

[www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## Utilização pretendida

**LDBIO TOXO II IgM** é um teste qualitativo de uso único diagnóstico serológico de IgM por immunoblot para a toxoplasmose, concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste.

## Princípio do teste

### Técnica de Western Blot

Os antígenos de *Toxoplasma gondii*, uma vez separados por eletroforese, são ligados por electroblotting à superfície de uma membrana de nitrocelulose (a que se chama a transferência) cortada em 24 tiras numeradas de 1 a 24.

### Condução do teste

Cada amostra a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antígenos. O conjugado fosfatase alcalina-anti IgM humana liga-se então aos anticorpos. Por fim, os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos do tipo IgM presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

## Reagentes fornecidos

Padrão: embalagem de 24 testes (#T2M-24M)

*italic*: embalagem de 12 testes (#T2M-12M) - **bold**: Embalagem de 96 testes (#T2M-96M).

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (12, <b>4x24</b> ) TIRAS: padrões pré-cortados + coloridos. (Cada pasta e cada transferência é identificada por um número de série único)	Nitrocelulose sensibilizada. Peso molecular colorido (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15.
R2	1	Frasco de 30 (30, <b>125</b> ) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R4	1	Frasco(s) de 30 (30, <b>2x60</b> ) ml de CONJUGADO ANTI IgM (Pronto a utilizar - solução amarela).	Tampão + conjugado de soro de cabra policlonal anti-IgM humana com fosfatase alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.
R5	1	Frasco de 30 (30, <b>125</b> ) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (60, <b>250</b> ) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (A diluir 10 vezes em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.
R10	1	Tubo de 100 (100, <b>2x100</b> ) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para <i>Toxoplasma</i> por serologia + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.

**R1:** The letter before each strip number is specific to the parameter.

**R2, R4, R5 e R6** são comuns a todos os kits e possuem um número de lote único, dependendo apenas da sua data de produção. **É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO Diagnostics) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.**

**R10** é calibrado em immunoblot de acordo com um lote de referência e é dedicado apenas a esta técnica.

R4, R10 (NaN3): EUH 032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.  
EUH 210 Ficha de segurança fornecida a pedido bem como no nosso site [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com).

## Material necessário mas não disponibilizado

- Tabuleiros de incubação multicanal em polipropileno para mini-blots (#WBPP-08 ou equivalente).
- Plataforma oscilatória para immunoblots, sistema de vácuo para líquidos (os tubos #WBPP-08 que fornecemos podem ser esvaziados por simples inversão).
- Tubos e material para recolher as amostras, cilindros graduados, contentores adaptados. Pipetas automáticas, micropipetas e pontas descartáveis (volumes de 10 µl, 1,2 ml e 2 ml).
- Água destilada ou desionizada. Papel absorvente (por ex. papel de filtro Whatman), fita adesiva transparente.
- Luvas, pinça para manipular as tiras, cortador ou bisturi, régua plana transparente.

Nota: Os nossos reagentes podem ser utilizados num processador automático de immunoblots. **Devem tomar-se precauções relativamente a possíveis contaminações químicas dos nossos reagentes se o processador for partilhado com reagentes de outro fabricante** (exemplo conhecido: contaminação por TWEEN 20) e a possíveis contaminações bacterianas. Frascos de reserva para o processador. Depois do processamento, não voltar colocar os restos de reagentes utilizados nos frascos originais.

## Conservação e estabilidade

Conservar entre 2 e 8 °C. Os reagentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na embalagem exterior e nos rótulos dos frascos. Não use reagente contaminado ou turvo. O tampão de lavagem diluído a 1:10 é estável durante 2 meses a +2 a +8 °C e uma semana à temperatura ambiente.

## Cuidados na utilização

### Segurança

- Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para uso profissional. Apenas para pessoal treinado tecnicamente. Manusear de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais e considerar todos os reagentes e todas as amostras como potencialmente tóxicos e/ou infecciosos.
- Usar bata, luvas e óculos: não beber, comer ou fumar no laboratório. Não pipetar com a boca.
- O controle positivo é um soro de origem humana que foi inativado para os vírus HIV 1 e 2, hepatite B e hepatite C. Contudo, deve ser manuseado como um produto potencialmente infeccioso.
- O substrato contém uma mistura de NBT e BCIP, tóxica por contacto (pele e mucosas) e por inalação.
- Os reagentes contêm azida de sódio, que pode formar sais metálicos explosivos com o chumbo e o cobre. Enxaguar qualquer derrame com água.
- Eliminar os resíduos (amostras, pontas, tubos, líquido de lavagem, reagentes usados, ...) de acordo com as boas práticas utilizadas na indústria e as regulamentações atuais do país.
- Qualquer incidente grave deve ser objeto de declaração ao fabricante e às autoridades competentes.

### Cuidados

- Leia e interprete os resultados sob luz branca direta.
- É preferível usar todos os reagentes do mesmo lote. Se forem usados lotes diferentes, garanta a rastreabilidade.
- Não utilizar reagentes líquidos de lotes diferentes em conjunto.
- Utilizar as tiras por ordem numérica. Não misturar tiras com diferentes números de série; utilizar as transferências em sequência. Estabelecer um plano de distribuição específico antes de iniciar o teste.
- Não tocar nas tiras com os dedos; utilizar uma pinça.
- Os reagentes devem ser bem misturados antes da utilização, em especial o tampão de lavagem concentrado.
- Fechar os frascos após a utilização; não utilizar se tiver ocorrido introdução acidental de uma substância nos reagentes. Não utilizar reagente de um frasco que apresente sinais de vazamento. Não utilizar soluções turvas ou precipitadas.
- Utilizar apenas pontas de pipeta descartáveis. Evitar qualquer contaminação entre canais. Ter atenção à formação de espuma ou bolhas nas pontas de pipeta (contaminação bacteriana dos frascos de reagentes).
- Lavar os tabuleiros de incubação apenas com água limpa seguida de água destilada (nunca utilizar detergente ou lixívia).
- A omissão de uma amostra ou a distribuição de um volume inadequado pode tornar o teste negativo ou positivo, independentemente do seu verdadeiro estado.

## Recolha de amostras

Colher as amostras em tubos secos, de forma assética. É necessário um mínimo de 10 µl de soro.

Manter as amostras a 2 a 8 °C até serem processadas. Se for necessário armazená-las por mais de uma semana, congelar as amostras a  $-20 \pm 5$  °C. Não utilizar uma amostra contaminada. Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente.

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

## Preparação dos reagentes

**Tampão de lavagem:** Para 4 testes, num frasco limpo, diluir 10 ml de concentrado de lavagem 10x (R6) em 90 ml de água destilada ou desionizada. Tenha o cuidado de misturar bem o tampão diluído.

## Procedimento do teste

*Nota importante:* É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.

1. Preparar o plano de distribuição das amostras e do controlo positivo C+ (R10).

O teste só pode ser tecnicamente validado e a identificação feita, para um determinado número de série, ou reveladas as bandas específicas, através da utilização deste controlo. Uma tira C+ não pode ser usada para interpretar os resultados das tiras de um blot com um número de série diferente.

2. Cortar o número necessário de tiras (R1) utilizando um bisturi e uma régua plana transparente limpa e seca, mantendo a linha azul de posicionamento nas tiras: manter as tiras firmemente no seu lugar com a régua e cortá-las pelo lado da tensão (os números são visíveis através da régua).
3. Distribuir 1,2 ml de tampão da amostra (R2) em cada canal, de acordo com o plano estabelecido.
4. Deixe as tiras se reidratarem na superfície do tampão por aproximadamente 2 minutos, com o número visível no topo, ENTÃO, agite suavemente a bandeja para mergulhá-las totalmente no tampão
5. Distribuir as amostras e controlo(s) positivo(s): de acordo com o plano de distribuição, a uma taxa de 10 µl por canal. Agitar suavemente o tabuleiro após cada dispensa. Colocar o tabuleiro numa plataforma oscilatória. **Incubar durante 90 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**
6. Passo de lavagem: Esvaziar o conteúdo dos canais com uma pipeta de Pasteur ou voltando o tabuleiro de incubação ao contrário. Verter 2 a 3 ml de tampão de lavagem diluído em cada canal. Incubar na plataforma oscilatória durante 3 min. Repetir duas vezes e, em seguida, esvaziar o conteúdo dos canais. Assegurar que as tiras não se voltam durante estes passos.
7. Verter 1,2 ml de conjugado anti IgM (R4) em cada canal. Colocar o tabuleiro na plataforma oscilatória. **Incubar durante 60 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**
8. Passo de lavagem: repetir o passo 6.
9. Deitar 1,2 ml de substrato NBT/BCIP (R5) em cada um dos canais. Colocar na plataforma oscilatória e proteger da luz direta. **Incubar durante 60 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**

Independentemente do parâmetro, monitorizar a revelação da cor. A revelação pode ser interrompida se a cor de fundo da tira escurecer de tal modo que a leitura seja difícil (a qualidade dos passos de lavagens possui uma influência fundamental na cor de fundo). Ter em atenção que as tiras ficarão mais claras quando secas.

10. Interromper a reação, aspirando o substrato com uma pipeta de Pasteur ou voltando a tina de incubação ao contrário e deitando 2 ml de água destilada nos canais. Repetir este último passo de lavagem mais uma vez.
11. Secagem das tiras: Com os canais ainda cheios de água, pegar nas tiras pela extremidade numerada utilizando uma pinça e depositá-las, com o número visível, sobre um papel absorvente de Whatman. Deixar secar ao ar. A cor das tiras aclarará naturalmente enquanto secam. A interpretação só deve ser feita depois de concluída a secagem.
12. Conservação: Transferir as tiras para uma folha de papel, que será utilizada para as arquivar. Alinhar as linhas de posicionamento. Mantendo-as no lugar com a régua plana, colar a extremidade superior das tiras com a fita adesiva transparente.

Para uma boa interpretação, as tiras deve ser ordenadas por transferência e pela sua ordem numérica, espaçadas com um máximo de alguns milímetros entre si. Não é fiável comparar tiras que estejam muito afastadas (por ex. a nº 2 com a nº 15). **É perigoso** (resultados falsos) comparar tiras de diferentes kits (tiras com números de série diferentes).

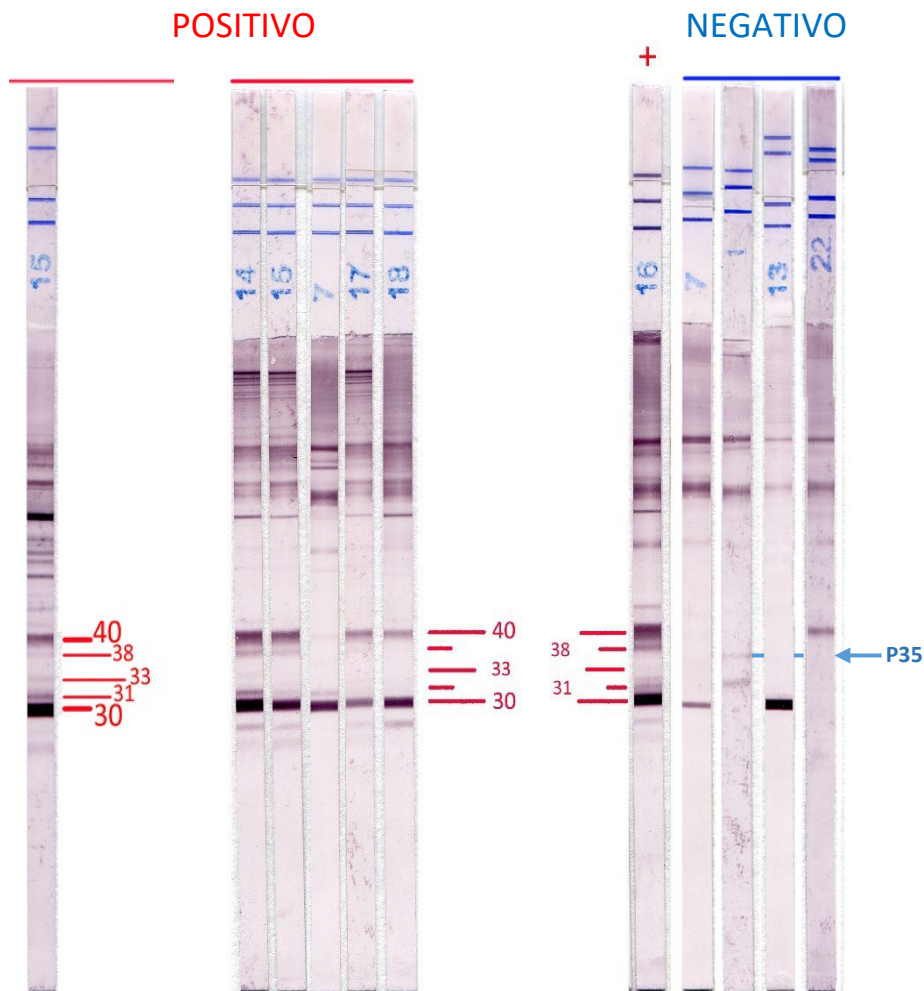
## Controlo de qualidade e interpretação

O controlo do soro (R10) disponibilizado com o kit deve ser sistematicamente incluído em qualquer série de immunoblot. Ele mostra o perfil típico e permite a validação técnica da boa execução do teste (as bandas devem aparecer muito distintamente na tira) e calibrar exatamente a posição e aspeto das bandas específicas de modo a permitir a interpretação dos resultados das tiras da mesma transferência (mesmo número de série).

*Nota:* O perfil de controlo positivo (R10) pode variar de acordo com o número de lote dos reagentes utilizados, e pode, em particular, não apresentar todas as bandas intermediárias (P31, 33, 38), mais raramente presentes em amostras positivas. As imagens correspondentes estão disponíveis no nosso website [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com) como exemplo.

### Descrição das bandas

Uma amostra positiva pode apresentar inúmeras bandas localizadas entre 15 e 200k kilodaltons (kDa). Procure a presença de bandas específicas na área de 30-40 kDa para cada uma das amostras testadas com as ferramentas de calibração descritas acima. Essas bandas, agrupadas e bem isoladas, são típicas e geralmente podem ser encontradas com muita facilidade.



**Fig. 1:** Exemplos de resultados positivos e negativos (Peso molecular: kDa)

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "K" específica para o parâmetro do lote "50016".

## Interpretação

A presença na tira de no **mínimo 2 bandas das bandas específicas P30, P31, P33, P38 e P40, E a inclusão da banda P30 kDa**, permite que o ensaio seja interpretado como positivo e concluir que anticorpos anti-T.gondii IgM estão presentes na amostra testada.

Nota:

- **P30 e P40** são as bandas mais frequentes em caso de serologia IgM positiva leve.
- Outras bandas (por exemplo, **P35**) podem ser observadas. Elas não são levadas em consideração na leitura do teste.

*Para validar os resultados, compare sempre o perfil do immunoblot de cada amostra com o do controlo positivo R10. O aspeto das bandas é importante para a interpretação do teste.*

## Limitações de utilização

- O diagnóstico de uma doença infecciosa não pode ser estabelecido com base em um único resultado de teste.
- Os resultados serológicos devem ser interpretados de acordo com as informações disponíveis (por exemplo, epidemiologia, clínica, imagem, biologia, etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico. Não devem ser utilizados como base para o diagnóstico apenas com base na sua positividade.

## Desempenhos

A avaliação foi realizada por meio de um estudo multicêntrico envolvendo quatro laboratórios de referência, especializados no diagnóstico de toxoplasmose.

A avaliação incluiu duas grupos de gestantes com teste IgM positivo: um foi seguido de seroconversão comprovada pelo aparecimento de IgG (93 seroconversões / 229 amostras), a outro de mulheres que tiveram IgM falso positivo por, pelo menos, uma técnica de rastreio e cuja inespecificidade foi então comprovada pelo acompanhamento iterativo das amostras sem seroconversão IgG (68 pacientes / 158 amostras)

Cada centro utilizou o seu próprio painel de técnicas de IgM, permitindo comparar o desempenho do WB com 6 kits disponíveis comercialmente.

### 1. Estudo do desempenho do WB na confirmação da seroconversão:

**Sensibilidade:** WB Toxo II IgM foi positivo para 91 das 93 seroconversões, confirmando a infeção por Toxoplasma.

$$Se = 97,8\% (95CI [91,7-99,6\%])$$

**Especificidade:** WB Toxo II IgM foi negativo para 61 dos 68 pacientes com falso IgM, confirmando a ausência de infeção por Toxoplasma.

$$Sp = 89,7\% (IC95 [79,3\%-95,4\%]).$$

### 2. Estudo de desempenho comparativo do WB Toxo II IgM, amostra por amostra:

Todos os resultados de WB (n=387) foram comparados com os obtidos pelas 6 outras técnicas utilizadas no estudo nos 4 laboratórios de referência: IgM ELISAs ou automatização e ISAGA IgM.

**Os resultados detalhados deste estudo foram publicados:** "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.](https://doi.org/10.3390/pathogens11060665/Supplementary%20material%20File%201)

O WB apresenta sensibilidade equivalente e maior especificidade do que todas as outras técnicas utilizadas.

As excelentes performances do kit LDBIO TOXO II IgM justificam a sua utilização como confirmação dos resultados obtidos pelas técnicas de rastreio de IgM (resultados ambíguos, resultados positivos fracos ou resultados com dificuldades de interpretação).

## Reprodutibilidade

Foi testada a reprodutibilidade inter-série e inter-lote. Em ambos os casos, a correlação soro a soro relativamente às bandas específicas é excelente.

## Interferências

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

## Resolução de problemas

**"As bandas estão pálidas, com pouco contraste":** Certos soros com baixas concentrações de anticorpos podem dar este tipo de resultados.

**"São visíveis áreas sombreadas, mais ou menos coloridas, ligeiramente difusas":** A tira não foi totalmente mergulhada num dos reagentes e não incubou corretamente ao longo de todo o seu comprimento. Também podem ocorrer manchas nos locais onde a amostra foi depositada se o tabuleiro não tiver sido agitado após a distribuição.

**"O ruído de fundo é significativo, tornando a leitura muito difícil":** As lavagens foram insuficientes ou a última incubação foi demasiado longa. Assegurar boas técnicas de desempenho do teste, respeitar os tempos de lavagem e assegurar a boa qualidade da água. Reduzir o tempo da última incubação.

Excepcionalmente, alguns soros poderão reagir de modo inespecífico. Neste caso, o resultado do imunoblot não pode ser utilizado.

Este ruído de fundo inespecífico pode envolver apenas parte da tira, invalidando a interpretação dos resultados apenas para aquela porção.

**"Aparece um precipitado na solução durante o último passo da revelação":** o substrato pode, efetivamente, precipitar parcialmente (flocos pretos) no tampão no final da revelação. Este fenómeno não altera a qualidade da revelação, que deve ser continuada normalmente. A última lavagem com água destilada elimina as eventuais partículas sólidas presentes.

## 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](https://doi.org/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/VI.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 ». 25<sup>th</sup> 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.

#### NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
29/06/2022	Vs 02	Desempenho: referência a publicação em vez de tabela-atualização referências dos kits
30/11/2022	Vs03	Nova morada
02/01/2023	Vs04	R6 sem NaN3. Tira identificadas por letra Possibilidade de usar reagentes de diferentes lotes.
06/02/2023	Vs05	Indicação da banda P35 (não específica)
20/09/2023	Vs06	Nome e referências em azul



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)