

**TOXOPLASMA**      CE0459



**Western Blot IgG IgM**

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

#TOP-WB24GM: 24 testes

#TOP-WB12GM: 12 testes

#TOP-WB96GM: 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

**TOXOPLASMA Western Blot (WB) IgG IgM** é um teste imunoblot qualitativo de uso único de Comparação dos Perfis Imunológicos (CIP-WB) IgG e IgM destinado ao diagnóstico de:

- Toxoplasmose congénita à nascença (D0): CIP-WB G+M entre o sangue materno e o sangue do cordão.
- A toxoplasmose congénita em acompanhamento pós-natal (D+N): CIP-WB G+M entre o sangue do cordão em D0 e o sangue da criança em D+N.
- A toxoplasmose ocular: CIP-WB IgG entre o soro do doente e o humor aquoso.

Este teste não se destina a rastreio nem a confirmação de serologias isoladas. Para esta aplicação, utilizar o teste **LDBIO TOXO II IgG** (Ref. TOXO II IgG WB).

## 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

*Nota bene:* Os testes imunoblot IgG ou IgM descritos abaixo são feitos em simultâneo aquando da manipulação.

#### Imunoblot IgG

O teste consiste em incubar separadamente, **com 2 bandas contíguas decorrentes da mesma transferência**, os dois amostras (soros, humor aquoso) dos quais se pretende comparar os perfis Imunológicos.

- Etapa 1: Cada amostra de soro (ou humor aquoso) a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos anti-*Toxoplasma* potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antígenos de *T. gondii*.
- Etapa 2: O conjugado fosfatase alcalina-**anti IgG humana** liga-se então aos anticorpos anti-*Toxoplasma*.
- Etapa 3: Os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Toxoplasma da classe IgG* presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

#### Imunoblot IgM

O teste é idêntico no seu princípio, substituindo na etapa 2 o conjugado precedente por um conjugado Fosfatase Alcalina – **anti-IgM humana**. A revelação evidenciará as bandas antigénicas reconhecidas pelos anticorpos anti-toxoplasma **da classe IgM** presentes nas amostras.

#### Leitura

A comparação sucessiva dos pares de bandas IgG mais IgM permite observar a presença eventual de bandas reveladas apenas por um dos amostras e não pelo outro (ver parágrafo Interpretação).

## REAGENTES FORNECIDOS

Padrão: embalagem de 24 testes (#TOP-WB24GM)

*italic:* embalagem de 12 testes (#TOP-WB12GM) - **Bold:** Embalagem de 96 testes (#TOP-WB96GM).

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 ( <i>12</i> , <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 ( <i>30</i> , <b>125</b> ) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R3	1	Frasco(s) de 30 ( <i>30</i> , <b>60</b> ) ml de CONJUGADO ANTI IgG (Pronto a utilizar - solução azul).	Tampão + conjugado de soro de cabra policlonal anti-IgG humana com fosfatase alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.
R4	1	Frasco(s) de 30 ( <i>30</i> , <b>60</b> ) ml de CONJUGADO ANTI-IgM (Pronto a usar - solução amarelo).	Tampão + soro policlonal de cabra anti-IgM humanas conjugado com fosfatase alcalina + NaN3 (inf. 0,1%) + estabilizantes.
R5	1	Frasco de 30 ( <i>30</i> , <b>125</b> ) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 ( <i>60</i> , <b>250</b> ) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x ( <u>A diluir 10 vezes</u> em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.

**R1:** A letra antes de cada número de tira é específica para o parâmetro.

**R2, R3, 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) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.**

R3, R4, (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 25 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 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 utilizar todos os reagentes de um mesmo lote. Se forem utilizados lotes diferentes, assegurar a rastreabilidade.
- 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 35 µl de soro, ou de 10 µl de humor aquoso. Nos casos de humor aquoso, o uso de 25 µl aumentará a sensibilidade do teste (Consulte § Procedimento do teste).

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 bene:* 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.

**É rigorosamente obrigatório** efetuar a comparação de um par de amostras com a ajuda de bandas conjuntas (números contíguos) decorrentes de uma mesma transferência (mesmo número de série). 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).

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 segundo o plano de distribuição estabelecido (etapa 1) e os volumes abaixo:

	Soro	Humor aquoso
IgG	10µl	10 ou 25µl
IgM	25µl	-

Nos casos de humor aquoso, o uso de 25 µl aumentará a sensibilidade do teste.

Agitar suavemente o tabuleiro após cada dispensa. Colocar o tabuleiro numa plataforma oscilatória. **Incubar durante 90 min.  $\pm$  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. Distribuir segundo o plano de distribuição estabelecido 1,2 ml de conjugado anti-IgG (R3) ou 1,2 ml de conjugado anti-IgM (R4) em cada um dos poços correspondentes. Colocar o tabuleiro numa 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.

- É indispensável parar ao mesmo tempo a revelação de 2 bandas de um mesmo par para uma mesma subclasse de anticorpos mas podemos parar de modo independente a das IgG ou das IgM (as IgM, em concentração mais fraca, revelam-se habitualmente de forma mais lenta do que as IgG).
- soro de criança em geral é menos carregado de IgM. É preciso dar tempo para que a reação se revele corretamente e não ter receio de ver a tira de IgM materna escurecer um pouco mais.
- humor aquoso é geralmente menos carregado de anticorpos. É preciso dar tempo para que a reação se revele corretamente e não ter receio de ver as bandas séricas escurecerem um pouco mais.

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 - leitura: Transferir as tiras para uma folha de papel, que será utilizada para as arquivar. Alinhar as linhas de posicionamento. Segurá-las com a régua plana e colá-las ao alto com a ajuda da fita adesiva transparente.

Emparelhar lado a lado as bandas IgG e IgM de cada par de amostras numa ordem de números crescente, seguindo o plano de distribuição estabelecido (etapa 1).

**É rigorosamente obrigatório efetuar a comparação de um par de amostras com a ajuda de bandas conjuntas (números contíguos) decorrentes de uma mesma transferência (mesmo número de série).** 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

### Descrição das bandas

Uma amostra positiva pode apresentar muitas bandas situadas entre 15 e 200k kDa. Apenas as bandas de peso molecular inferior a 120 kDa podem ser utilizáveis para a comparação de perfis.

### Interpretação

#### CIP WB G+M (Toxoplasmose congénita)

- À nascença (pares Mãe / Filho):

Comparar de modo independente as bandas IgG e as bandas IgM. Ler as 2 bandas contíguas

simultaneamente de cima para baixo notando todas as bandas antigénicas **presentes** no sangue do cordão **e ausentes** do soro materno.

Todas as bandas de resolução bem definida, de Peso Molecular (PM) inferior a 120 kDa e *presentes apenas na criança*, testemunham a síntese pela criança de anticorpo anti-toxoplasma, favorável a uma toxoplasmose congénita.

- Aquando do acompanhamento pós-natal (pares Criança DO / Criança D+N):

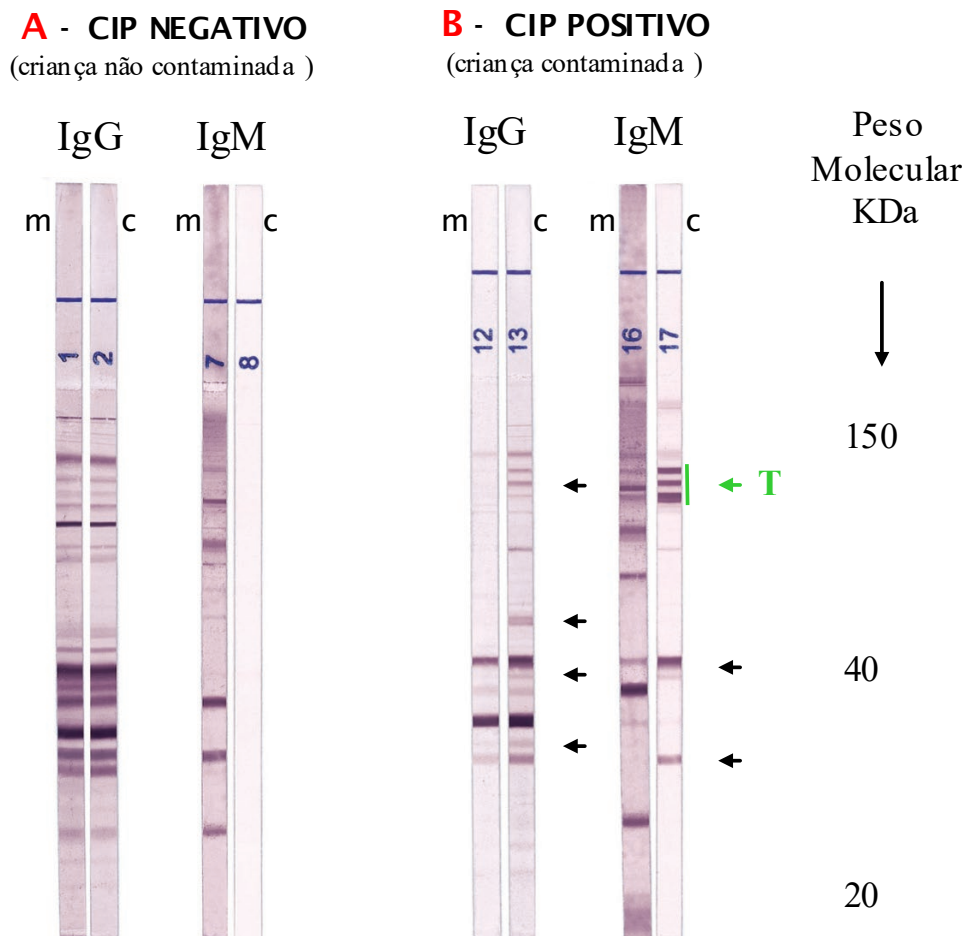
Comparar de modo independente as bandas IgG e as bandas IgM.

Ler as 2 bandas contíguas simultaneamente de cima para baixo notando todas as bandas antigénicas **presentes** no soro de D+N **e ausentes** do sangue do cordão.

Todas as bandas de resolução bem definida, de Peso Molecular (PM) inferior a 120 kDa e *presentes apenas em D+N*, testemunham a síntese pela criança de anticorpo anti-toxoplasma, favorável a uma toxoplasmose congénita.

*Note bene:* a indicação do CIP-WB IgG/IgM no acompanhamento pós-natal é voluntariamente limitada a 3 meses na IgG e a 1 mês na IgM.

Observações: A justaposição do padrão de peso molecular colorido (bolsa R1) permite estimar o PM das bandas antigénicas reveladas (é necessário antes recortá-las com a ajuda de uma régua e de um estilete como uma tira comum e manipulá-la com uma pinça).



**Fig. 1:** Toxoplasmose congénita - Exemplos de resultados positivos e negativos (m= mãe ; c=criança)

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "A" específica do parâmetro do lote "00011".

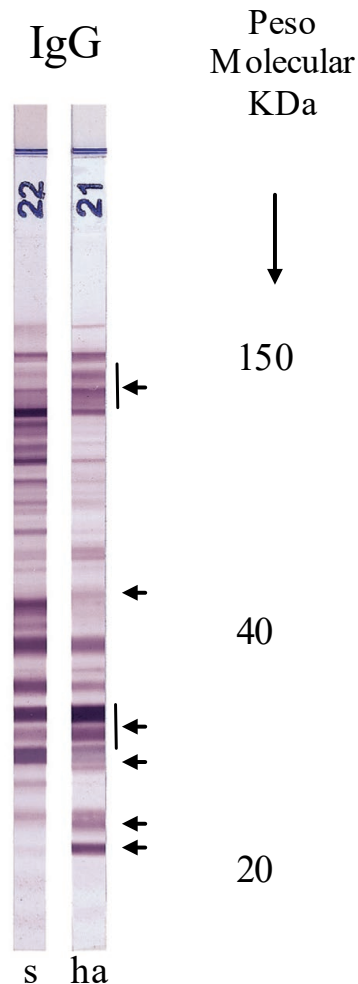
**O par mãe-criança (A)** corresponde a uma mãe contaminada durante a gravidez mas cuja criança é imune: Os perfis IgG são rigorosamente idênticos (IgG transmitidas); não há nenhuma banda suplementar presente nas bandas IgG e/ou IgM da criança: **O CIP-WB É NEGATIVO.**

**O par (B), toxoplasmose congênita,** corresponde a uma mãe contaminada durante a gravidez e cuja criança está igualmente contaminada. Além dos anticorpos transmitidos, observamos perfeitamente nas bandas da criança a presença de bandas suplementares (←), em IgG e/ou em IgM, correspondente aos anticorpos neo-sintetizados pela criança: **O CIP-WB É POSITIVO.**

### CIP WB IgG (Toxoplasmose ocular):

Ler as 2 bandas contíguas simultaneamente de cima para baixo notando todas as bandas antigénicas **presentes** no humor aquoso **e ausente** do soro.

Todas as bandas de resolução bem definida, de Peso Molecular (PM) inferior a 120 kDa e *presentes apenas no humor aquoso*, testemunham a síntese pela criança de anticorpo anti-toxoplasma, favorável a uma toxoplasmose ocular.



**Fig. 2:** Toxoplasmose ocular - Exemplos de resultados positivos – (s= soro; ha= humor aquoso)

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "A" específica do parâmetro do lote "00011".



## Observações muito importantes:

1. Os resultados do CIP-WB IgG/IgM devem ser interpretados tendo em conta outras informações clínicas, serológicas, parasitológicas, epidemiológicas, imagiologia clínica, a fim de estabelecer o diagnóstico de toxoplasmose congénita ou ocular.
2. Um resultado CIP-WB IgG/IgM negativo não exclui o diagnóstico de toxoplasmose congénita ou ocular. Estes doentes devem necessariamente ser seguidos no tempo até que o diagnóstico de toxoplasmose possa ser definitivamente confirmado ou descartado.
3. As bandas podem ser de aparência muito variável: finas, grossas, mais ou menos coloridas, intensas...  
É recomendado, ao adquirir esta técnica, realizar algumas comparações de perfis nos pares de amostras conhecidas a fim de se familiarizar com a sua leitura.  
É igualmente recomendado que a leitura dos CIP-WB seja de início efetuada de modo independente por duas pessoas no Laboratório. Em caso de discordância de interpretação, deve ser realizado um CIP-WB de controlo.
4. As frações antigénicas de pesos moleculares (PM) muito altos estão muito apertadas no topo da tira em benefício de uma melhor resolução das frações de médio e baixo PM. As bandas de PM > 120kDa não são, por isso, utilizáveis para a interpretação do teste: as amostras que apresentem unicamente tais diferenças de perfil não podem ser tornadas positivas.
5. Pelo contrário (Toxoplasmose congénita), um “trio” (três bandas reconhecíveis muito facilmente) situado entre 75 e 100 kDa encontra-se muito facilmente nos CIP WB IgM positivos (ver “T” Fig. 1 tira N° 17 à direita).
6. À nascença (Toxoplasmose congénita), devemos desconfiar particularmente de qualquer reforço geral de intensidade das bandas (hemoconcentração) que possa fazer pensar em bandas suplementares no sangue do cordão. Os soros que apresentem tais diferenças de perfil são tornados negativos.
7. Por oposição (Toxoplasmose congénita, Toxoplasmose ocular), o reforço significativo (muitas vezes em largura e em intensidade) de uma ou duas banda(s) isolada(s) quando todas as outras bandas são de intensidade idêntica ou mais fracas é muitas vezes considerado um critério de positividade.
8. Anticorpos naturais (Toxoplasmose congénita):  
A técnica de imunoblot é extremamente sensível e o antigénio utilizado para o teste CIP WB foi selecionado pela multiplicidade de bandas antigénicas presentes na tira.  
Diversas publicações constataam bandas reveladas por imunoblot em pessoas que aparentemente nunca tinham contraído toxoplasmose. Estes anticorpos (IgG e IgM) só raramente são detetadas pelas outras técnicas mas são-no muito frequentemente por imunoblot. Dever-se-iam a reações cruzadas com anticorpos dirigidos contra imunogénios de natureza ainda não determinada.  
É a razão pela qual a indicação do teste **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** é reservada à comparação de perfis. (Para a confirmação das serologias IgG, utilizar apenas o teste **LDBIO TOXO II IgG** que é específico e se destina a esta utilização)  
Os recém-nascidos não apresentam anticorpos naturais (além dos anticorpos maternos transmitidos) mas a probabilidade de aparecimento dos anticorpos naturais aumenta com a idade do bebé ao fim de 3 meses; só raramente são encontrados entre 3 e 6 meses.  
É a razão pela qual a indicação do CIP-WB IgG/IgM no acompanhamento pós-natal é voluntariamente limitado a 3 meses na IgG e a 1 mês na IgM: o aparecimento de bandas não específicas é na realidade mais precoce na IgM.
9. “Heat Shock Protein” (toxoplasmose congénita):  
Uma banda fina não específica, de intensidade fraca mas variável, pode estar presente na IgM à altura de 37 kDa. Trata-se de um artefacto ligado à preparação do antigénio e denominado “Heat Shock Protein”. Presente ao mesmo tempo nas duas bandas do par mãe-filho, pode por vezes no entanto parecer mais pronunciada com certos soros durante o acompanhamento da criança. Não ter em conta essa banda.
10. CIP-WB (toxoplasmose ocular): O CIP-WB IgM não tem qualquer utilidade no diagnóstico da toxoplasmose ocular. No entanto, o CIP-IgA é de interesse diagnóstico nessa situação. Para mais informações sobre CIP-IgA, entre em contato conosco.

## 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 (ver referências bibliográficas P.12)

Estes estudos foram realizados por laboratórios de referência independentes.

### CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSE CONGENITA à nascença (Mãe/Filhos)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DADOS CLÍNICOS	CT POS n=54	41	13
	CT NEG n=60	0	60

**Tabela. 1:** Desempenhos do CIP-WB IgG/IgM à nascença (n = 114)

**Especificidade = 100%**

**Valor preditivo positivo = 100%**

**Sensibilidade = 76%**

**Valor preditivo negativo = 83%**

### CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSE CONGENITA no acompanhamento pós-natal (Criança D0/D20)

Entre as 54 anteriormente testadas no D0 (**tabela 1**), 10 crianças imunes e 12 crianças contaminadas (n=22) foram seguidas até ao D20 e analisadas retrospectivamente com o teste **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **Ao D0:** 4 crianças entre as 12 crianças contaminadas não apresentavam perfil diferente à nascença (falsos negativos).
- **Ao D20:** apenas 1 continua negativo:

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DADOS CLÍNICOS	CT POS n=12	11	1
	CT NEG n=10	0	10

**Tabela 2:** desempenhos do CIP-WB IgG/IgM ao D20 (n = 22)

**Especificidade = 100%**

**Valor preditivo positivo = 100%**

**Sensibilidade = 92%**

**Valor preditivo negativo = 91%**

### CIP-WB IgG: TOXOPLASMOSE OCULAR (soro / humor aquoso)

Os desempenhos indicados abaixo pertencem à meta-análise para quatro estudos publicados por centros de referência.

Estes estudos comparam o desempenho do CIP-WB **IgG** com os do coeficiente de Goldmann Witmer (GWC) e os da PCR. Além disso, ilustram os desempenhos de diagnóstico obtidos pela associação combinada de duas ou três destas técnicas.

Estes quatro estudos utilizaram o teste LDBIO em conformidade com as recomendações das instruções de utilização do kit.

A sensibilidade foi determinada em 113 doentes que apresentavam toxoplasmose ocular clinicamente comprovada. A especificidade foi calculada numa população de controlo que apresentava outra doença ocular que não a infeção toxoplásmica: toxocaríase ocular (n=5), infeção rival (n=10), outras infeções (n=4), doenças oculares não infecciosas (n=126) entre as quais cataratas (n=42).

### Sensibilidade (Se)

A sensibilidade global de CIP-WB IgG é de **62,8%** (n=113), um desempenho que pode ser comparado com o GWC (Se=61,0%, n=113) e superior à PCR (Se=43,5%, n=92, p=0,0028).

A combinação de CIP-WB com o GWC e a PCR melhora a sensibilidade do diagnóstico:

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

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

### Especificidade (Sp)

A especificidade global do CIP-WB IgG é de **92,8%** (n=111), desempenho que pode ser comparado com o GWC (Sp=94,2%, n=139) e inferior à PCR (Sp=100%, n=131, p=0,0009).

A combinação das duas técnicas, CIP-WB IgG + GWC, reduz ligeiramente a especificidade do diagnóstico (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). A combinação com a PCR não influencia a especificidade.

### Conclusão

O imunoenensaio **Toxoplasma WB IgG IgM** tem excelente desempenho no diagnóstico da toxoplasmose congênita ou ocular.

Na toxoplasmose congênita, o CIP-WB G + M tem uma sensibilidade de **76%** [95CI 62-86%] e uma especificidade de **100%** [95CI 92-100%] ao nascimento. O novo teste no primeiro mês de vida aumenta ainda mais a sensibilidade do CIP-WB G + M.

Na toxoplasmose ocular, CIP-WB IgG tem uma sensibilidade de **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] e uma especificidade de **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. A combinação com outras técnicas (GWC e / ou PCR) aumenta o desempenho diagnóstico.

### 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 immunoblot 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

- 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).
- 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).

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

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
26/07/2021	Vs 18	Remoção do aviso de segurança R5 - Endereço de e-mail de contacto – NaN3 EUH 032.
29/07/2022	Vs 19	R6 sem NaN3. Tira identificada pela letra A. Possível utilização de reagentes de diferentes lotes
30/11/2022	Vs20	Novo endereço



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)