

LDBIO TOXO II IgM CE0459



POTVRDNI

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatska / ručna tehnika

#T2M-24M: 24 testova

#T2M-12M: 12 testova

#T2M-96M: 96 testova

UPUTSTVO ZA UPOTREBU

Pronađite više informacija i uputstva prevedena na vaš jezik na našem
sajtu [www.ldbiodiagnostics.com](http://www ldbiodiagnostics.com)



LDBIO TOXO II Western Blot IgM



NAMENA

LDBIO TOXO II IgM je kvalitativni test serološke IgM dijagnoze za jednokratnu upotrebu imunoblot testom toksoplazmoze namenjen za potvrdno testiranje pozitivnog ili dvosmislenog rezultata dobijenog klasičnim skrining testovima.

PRINCIP TESTA

Western Blot tehnika

Antigeni *Toxoplasma gondii*, jednom razdvojeni elektroforezom, vezani su elektroblottingom na površinu nitrocelulozne membrane (nazvane transfer) isečene na 24 trake numerisane od 1 do 24.

Sprovođenje testa

Svaki uzorak koji se testira je odvojeno inkubiran sa trakom. Specifična antitela potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vezuju za antigene. Alkalni fosfataza-anti humani IgM konjugat se zatim vezuje za vezana antitela. Konačno, imunokompleksi reaguju sa supstratom. Antigeni prepoznati od strane specifičnih antitela tipa IgM prisutnih u uzorcima otkrivaju se kao ljubičaste poprečne trake.

ISPORUČENI REAGENSI

Podrazumevano: paket od 24 testa (#T2M-24M)

Kurziv: paket od 12 testova (#T2M-12M) – **Bold:** paket od 96 testova (#T2M-96M)

ID	Količina	Opis	Sastav
R1	1	Fascikla (i) od 24 (12, 4x24) trake: precut + obojeni standardi. (Svaka fascikla i svaki prenos je identifikovan jedinstvenim serijskim brojem)	Senzibilizovana nitroceluloza. Obojena molekulska težina (kDa): Plava: 250, Plava: 150, Plava: 100, Roze: 75, Plava: 50, Zelena: 37, roze: 25, plava: 20, plava: 15.
R2	1	Bočica od 30 (30, 125) mL SAMPLE BUFFER (Spreman za upotrebu - roze rastvor).	Pufer + površinski aktivna supstanca.
R4	1	Bočica (e) od 30 (30, 2x60) mL ANTI IgM CONJUGATE (Spreman za upotrebu - žuti rastvor).	Pufer + anti-humanu IgM poliklonu serumi konjugirani sa alkalnom fosfatazom + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.
R5	1	Bočica od 30 (30, 125) mL SUPSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (60, 250) mL koncentrata za pranje 10X BUFFER (Da se razblaži 10 puta u destilovanoj vodi - bezbojan rastvor).	Pufer + površinski aktivna supstanca.
R10	1	Epruveta od 100 (100, 2x100) µL POZITIVNOG KONTROLNOG SERUMA (Spreman za upotrebu).	Pufer + skup humanih seruma pozitivnih u <i>Toxoplasma</i> serologiji + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.

R1: Slovo pre svakog broja trake je specifično za parametar.

R2, R4, R5 i R6 su zajednički za sve komplete i imaju jedinstven broj lota u zavisnosti samo od datuma njihove proizvodnje. **Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.**

R10 je kalibrisan u imunoblotu prema referentnom lotu i posvećen je samo ovoj tehnici.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma otrovan gas.

EUH 210 Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtev kao i na našoj veb stranici www.ldbiodiagnostics.com

DODATNI MATERIJAL POTREBAN, ALI NIJE OBEZBEĐEN

- Jedna višekanalna polipropilenska inkubaciona posuda za mini-blots (#WBPP-08 ili ekvivalent).
- Jedna platforma za mešanje imunoblota, jedan vakuumski sistem za tečnosti (kade #WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Epruvete i materijal za izvlačenje uzoraka, graduirani cilindri, prilagođeni kontejneri. Automatske pipete, mikropipete i nastavci za jednokratnu upotrebu (zapremine 10 µL, 1,2 mL i 2 mL).
- Destilovana ili dejonizovana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna lepljiva traka.
- Rukavice, pinceta za rukovanje trake, sekač ili skalpel, ravan transparentan lenjir.

Napomena: Naši reagensi se mogu koristiti u automatizovanom imunoblot procesoru. Treba voditi računa o mogućim hemijskim kontaminacijama naših reagenasa ako se procesor deli sa reagensima drugog proizvođača (poznati primer: kontaminacija od strane TWEEN 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervne bočice za procesor. Nakon obrade, ne stavljajte preostale korišćene reagense nazad u originalne bočice.

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Čuvati između 2 i 8 ° C. Reagensi iz kompleta su stabilni do isteka roka trajanja navedenog na spoljnoj kutiji i etiketama bočica. Nemojte koristiti kontaminirane ili zamucene reagense. Pufer za ispiranje razblažen na 1/10 je stabilan 2 meseca na +2 do +8 °C i nedelju dana na sobnoj temperaturi.

MERE PREDOSTROŽNOSTI ZA UPOTREBU

Bezbednost

- Samo za *in vitro* upotrebu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički obučeno osoblje. Rukovati u skladu sa dobrim laboratorijskim praksama i razmotriti bilo koji reagens i bilo koji uzorak kao potencijalno toksičan i / ili infektivni.
- Nosite laboratorijski mantil, rukavice i naočare; Nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriji. Ne pipetirajte ustima.
- Pozitivna kontrola je serum ljudskog porekla koji je inaktiviran za HIV 1 i 2, viruse hepatitisa B i hepatitisa C. Međutim, mora se rukovati kao potencijalno infektivnim proizvodom.
- Supstrat sadrži mešavinu NBT i BCIP, toksičan u kontaktu (koža i sluzokože) i udisanjem.
- Reagensi sadrže natrijum azid koji može da formira eksplozivne metalne soli sa olovom i bakrom. Isperite svako izlivanje vodom.
- Odložite otpad (uzorci, nastavci, epruvete, tečnost za pranje, korišćeni reagens ...) u skladu sa dobrim praksama koje se koriste u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljan incident mora biti predmet izjave proizvođaču i nadležnom organu.

Predostrožnosti

- Pročitajte i interpretirajte rezultate pod direktnim belim svetlom.

- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, obezbedite sledljivost.
- Koristite trake u numeričkom redosledu. Ne mešajte trake iz različitih serijskih brojeva; Koristite transfere uzastopno. Uspostavite poseban plan distribucije pre početka testa.
- Ne dodirujte trake prstima; koristite pincetu.
- Reagensi se moraju dobro izmešati pre upotrebe, posebno koncentrisani pufer za pranje.
- Zatvorite bočice nakon upotrebe; Nemojte koristiti ako je supstanca slučajno uvedena u reagense. Nemojte koristiti reagens iz bočice koja predstavlja znake curenja. Nemojte koristiti zamućen ili istaložen rastvor.
- Koristite samo nastavke za pipete za jednokratnu upotrebu. Izbegavajte bilo kakvu međukanalnu kontaminaciju. Pazite na formiranje pene ili mehurića u nastavcima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica reagensa).
- Posude za inkubaciju čistite samo destilovanom vodom (nikada ne koristite deterdžent ili izbeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili distribucija neadekvatnog volumena može učiniti rezultat testa negativnim ili pozitivnim, bez obzira na njegov stvarni status.

KOLEKCIJA PRIMERAKA

Aseptički prikupiti uzorke u suvim epruvetama. Potrebno je najmanje 10 µL seruma.

Držite uzorke na 2-8 ° C dok se ne obrade. Ako ih treba čuvati duže od nedelju dana, zamrznete uzorke na -20 ± 5 °C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

PRIPREMA REAGENSA

Pufer za ispiranje: Za 4 testa, u čistoj boci, razblažite 10 ml koncentrata za pranje 10X (**R6**) u 90 ml destilovane ili deionizovane vode. Pazite da dobro izmešate razblaženi pufer.

POSTUPAK TESTIRANJA

Nota Bene: Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.

1. Pripremite plan distribucije za uzorke i C + pozitivnu kontrolu (**R10**).

Samo korišćenjem ove kontrole test može biti tehnički potvrđen i identifikacija napravljena, za dati serijski broj, specifičnih razvijenih traka. C + traka se ne može koristiti za tumačenje rezultata traka iz traka boje drugog serijskog broja.

2. Odrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suvog ravnog prozirnog lenjira, zadržavajući plavu liniju pozicioniranja na trakama: držite trake čvrsto na mestu sa lenjirom i izrežite ih sa strane naprežanja (brojevi su vidljivi kroz lenjir).
3. Distribuirati 1.2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu u skladu sa utvrđenim planom.
4. Depozit, u svom numeričkom redosledu, numerisane trake u kanalima: Neke trake se rehidriraju na površini pufera za oko 2 minuta, sa brojem vidljivim na vrhu, onda lagano protresite ležište da ih potpuno uronite u pufer.
5. Distribuirajte uzorke i pozitivne kontrole: prema planu distribucije, po stopi od 10 µL po kanalu. Lagano protresite poslužavnik nakon svakog doziranja. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 90 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.
6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala Pasterovom pipetom ili okretanjem posude za inkubaciju. Raspršite 2 do 3 ml razblaženog pufera za ispiranje u svakom kanalu. Inkubirajte na platformi za mešanje 3 minuta. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Uverite se da se trake ne okreću tokom ovih koraka.

7. Nanesite 1.2 mL anti IgM konjugata (R4) u svaki kanal. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 60 minuta** \pm 5 minuta na 20-26 °C.
8. Korak ispiranja: ponovite korak 6.
9. Distribuirajte 1.2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Postavite na platformu za mešanje i zaštitite od direktne svetlosti. **Inkubirati 60 minuta** \pm 5 minuta na 20-26 °C.

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do tačke u kojoj je teško čitati (kvalitet koraka ispiranja ima fundamentalni uticaj na obojenost pozadine). Imajte na umu da će trake olakšati dok se suše.

10. Zaustavite reakciju aspiracijom supstrata sa Pasterovom pipetom ili okretanjem kade za inkubaciju i doziranjem 2 ml destilovane ili dejonizovane vode u kanalima. Ponovite ovaj poslednji korak pranja još jednom.
11. Sušenje traka: Dok su kanali još uvek ispunjeni vodom, pincetom uzmite trake za numerisani kraj i položite ih, sa vidljivim brojem, na upijajući papir Whatman. Ostavite da se osuši na vazduhu. Boja traka će prirodno osvetliti tokom sušenja. Tumačenje se mora izvršiti tek nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Prenesite trake na list papira, koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte plave linije pozicioniranja. Držeći ih na mestu ravnim lenjirom, vrh traka zalepite prozirnou lepljivom trakom.

Za dobro tumačenje, trake moraju biti postavljene u skladu sa njihovim numeričkim redosledom, razmaknute na maksimalno nekoliko milimetara. Nepouzdanost je upoređivati trake koje su razmaknute daleko (npr. br.2 sa br.15). **Opasno je** (lažni rezultati) upoređivati trake iz različitih kompleta (trake sa različitim serijskim brojevima).

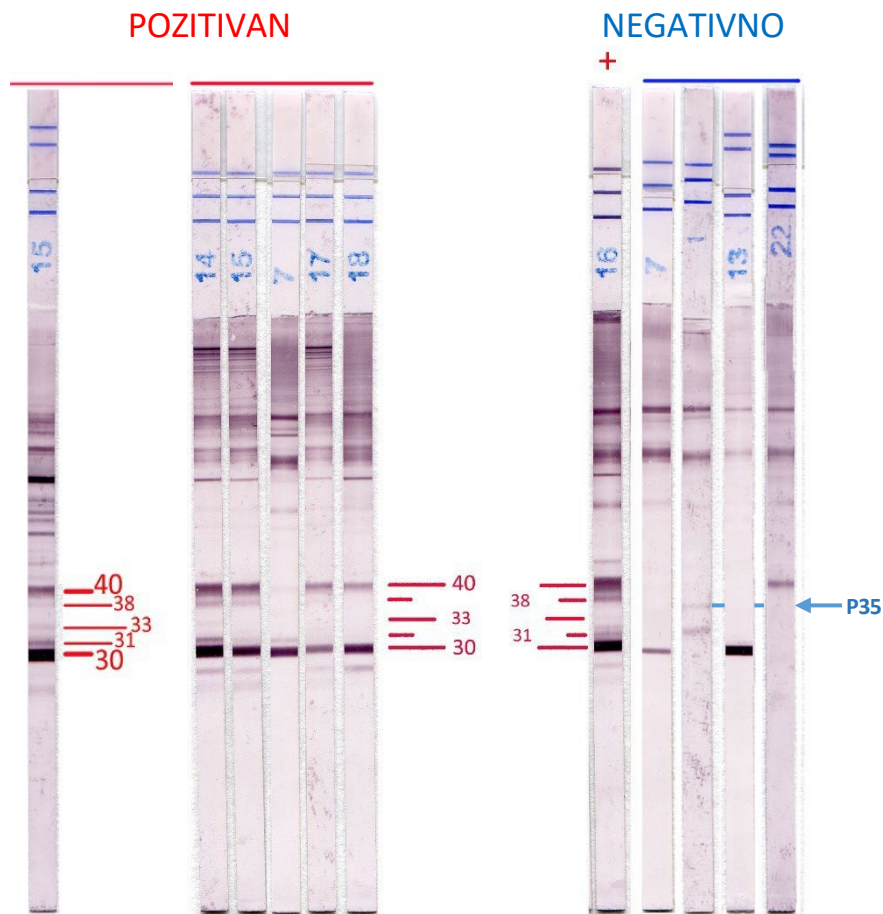
KONTROLA KVALITETA I TUMAČENJE

Kontrola seruma (R10) koja se isporučuje sa kompletom mora biti sistematski uključena u bilo koju seriju imunoblota. On pokazuje tipičan profil i omogućava (1) tehničku validaciju dobrog sprovođenja testa (trake boje moraju da se pojave vrlo jasno na traci) i (2) da precizno kalibrira položaj i aspekt specifičnih traka boje kako bi se omogućilo tumačenje rezultata traka iz istog prenosa (isti serijski broj).

Nota Bene: Pozitivna kontrola (R10) profil može da varira u zavisnosti od broja lota reagensa koji se koriste i posebno ne može predstaviti sve srednje opsege (P31, 33, 38), ređe prisutne u pozitivnim uzorcima. Odgovarajuće slike su dostupne na našem sajtu www.ldbiodiagnostics.com kao primer.

Opis traka

Pozitivan uzorak može predstaviti brojne opsege koji se nalaze između 15 i 200k kilodaltona (kDa). Potražite prisustvo specifičnih opsega u području od 30-40 kDa za svaki od testiranih uzoraka pomoću gore opisanih alata za kalibraciju. Ove trake, grupisane i dobro izolovane, su tipični i generalno se mogu naći vrlo lako.



Sl. 1: Primeri pozitivnih i negativnih rezultata (Molekulska težina: kDa)

Profili su dati kao primeri. Trake su označene slovom "K" specifičnim za parametar iz serije "50016".

Tumačenje rezultata

Prisustvo na traci **od najmanje 2 trake iz specifičnih opsega P30, P31, P33, P38 i P40, i uključivanje opsega P30 kDa**, omogućava da se test tumači kao pozitivan i da se zaključi da su anti-*T. gondii* IgM antitela prisutna u testiranom uzorku.

Imajte na umu:

- **P30 i P40** su najčešće trake u slučaju blagog pozitivnog IgM serološkog rezultata.
- Ostale trake (npr. **P35**) mogu se posmatrati. Oni se ne uzimaju u obzir prilikom čitanja testa.

Da biste potvrdili rezultate, uvek uporedite profil imunoblota svakog uzorka sa profilom pozitivne kontrole R10. Aspekt traka je važan prilikom tumačenja testa.

OGRANIČENJE UPOTREBE

- Dijagnoza zarazne bolesti ne može se utvrditi na osnovu jednog rezultata testa.
- Serološki rezultati moraju se tumačiti u skladu sa dostupnim informacijama (npr. Epidemiologija, klinička, snimanje, biologija ...) kako bi se postavila dijagnoza. Ne treba ih koristiti za postavljanje dijagnoze samo na osnovu njihove pozitivnosti.

UČINAK (vidi literaturu reference)

Procena je sprovedena kroz multicentričnu studiju koja je uključivala četiri referentne laboratorije, specijalizovane za dijagnozu toksoplazmoze.

Evaluacija je obuhvatila dve kohorte trudnica sa pozitivnim rezultatom IgM testa: jedna je bila praćenje serokonverzija dokazanih pojavom IgG (93 serokonverzije / 229 uzoraka), a druga žena koje su imale lažno pozitivan IgM najmanje jednom tehnikom skrininga i čija je nespecifičnost tada dokazana iterativnim praćenjem uzoraka bez IgG serokonverzije (68 pacijenata / 158 uzoraka)

Svaki centar je koristio sopstveni panel IgM tehnika omogućavajući poređenje performansi WB sa 6 komercijalno dostupnih kompleta.

1. Studija performansi SB u potvrdi serokonverzije:

Osetljivost: WB Toxo II IgM je bio pozitivan na 91 od 93 serokonverzije, potvrđujući *Toxoplasma* infekciju.

$$Se = 97.8\% (95CI [91.7-99.6\%])$$

Specifičnost: WB Toxo II IgM je bio negativan za 61 od 68 pacijenata sa lažnim IgM potvrđujući odsustvo infekcije *Toxoplasma*.

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

2. Komparativna studija performansi WB Toxo II IgM, uzorak po uzorku:

Svi rezultati WB (n = 387) su upoređeni sa onima dobijenim od strane 6 drugih tehnika koje su korišćene u studiji u 4 referentne laboratorije: IgM ELISA ili automati i ISAGA IgM.

Objavljeni su detaljni rezultati ove studije: "Dijagnostička tačnost LDBIO-Toxo II IgG i IgM Western Blot u sumnji na serokonverziju u trudnoći: multicentrična studija". Patogeni **2022**, 11(6), 665.
doi: 10.3390/pathogens11060665 / Dopunski materijal fajl 1.

WB pokazuje ekvivalentnu osetljivost i veću specifičnost od svih drugih tehnika koje se koriste.

Odlične performanse LDBIO TOXO II IgM kompleta opravdavaju njegovu upotrebu kao potvrdu rezultata dobijenih tehnikama skrininga IgM (dvosmisleni rezultati, slabi pozitivni rezultati ili rezultati sa poteškoćama u tumačenju).

Ponovljivost

Testirana je ponovljivost između serija i između lotova. U oba slučaja, korelacija između seruma u odnosu na određene trake je odlična.

Smetnje

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

REŠAVANJE PROBLEMA

"Trake su blede sa malim kontrastom": Određeni serumi sa niskim koncentracijama antitela mogu dati takve rezultate.

"Osenčena područja mogu se videti, više ili manje obojena, blago difuzna": Traka nije bila potpuno potopljena u jedan od reagenasa i nije pravilno inkubirala duž cele dužine. Mrlje boje mogu biti prisutne i tamo gde je uzorak deponovan ako poslužavnik nije uzdrman nakon doziranja.

"Pozadinski šum je značajan, što čitanje veoma otežava": Ispiranje je bilo nedovoljno ili je poslednja inkubacija bila preduga. Obezbedite dobre tehnike performansi testa, poštujujte vreme pranja i obezbedite kvalitet vode. Smanjite vreme poslednje inkubacije. Izuzetno, određeni serumi mogu reagovati na nespecifičan način. Zatim, rezultat imunoblota se ne može koristiti.

Ovaj nespecifični pozadinski šum može uključivati samo deo trake, čineći rezultate neinterpretabilnim samo za taj deo.

"Talog se pojavljuje u rastvoru tokom poslednjeg koraka razvoja": supstrat može u stvari delimično taložiti (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne menja kvalitet razvoja koji se mora normalno nastaviti. Poslednje ispiranje destilovanom vodom eliminiše moguće prisutne čvrste čestice.

BIBLIOGRAFIJA

- 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
- 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/CVI.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 ». 25th 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.

OBAVEŠTENJE AŽURIRANJA – Molimo vas da pažljivo pročitate

DATUM IZLASKA	VERZIJA	REZIME MODIFIKACIJE
29/06/2022	Vs 02	Performanse: referenca na publikaciju umesto tabele – referenca kompleta za ažuriranje
30/11/2022	Vs03	Nova adresa
02/01/2023	Vs04	R6 bez NaN ₃ . Strip identifikovan slovom. Moguća upotreba reagensa iz različitih serija.
06/02/2023	Vs05	Indikacija opsega P35 (nije specifično)
20/09/2023	Vs06	Ime i reference u plavoj boji



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com