

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatska / ručna tehnika

#TOP-WB24GM: 24 testova

#TOP-WB12GM: 12 testova

#TOP-WB96GM: 96 testova

UPUTSTVO ZA UPOTREBU

Pronađite više informacija i uputstva prevedena na vaš jezik na našem
sajtu www.ldbiodiagnostics.com



TOXOPLASMA Western Blot IgG IgM



NAMENA

TOXOPLASMA WB IgG-IgM je imunoblot test za jednokratnu upotrebu za poređenje imunoloških profila (CIP-WB) za IgG i IgM koji je namenjen dijagnosticanju:

- Kongenitalna toksoplazmoza pri rođenju (D0): CIP-WB G+M između krvi majke i krvi iz pupčane vrpce.
- Kongenitalna toksoplazmoza u postnatalnom monitoringu (D + N): CIP-WB G+M između krvi iz pupčane vrpce na D0 i krvi deteta na D+N.
- Očna toksoplazmoza: CIP-WB IgG između seruma pacijenta i očne vodice.

Ovaj test nije namenjen za skrining ili potvrđivanje izolovanih serologija. Za tu aplikaciju, koristite **LDBIO TOXO II IgG** test (ref. TOXO II IgG WB).

PRINCIP TESTA

Western Blot tehnika

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

Sprovođenje testa

Napomena: IgG ili IgM imunoblot testovi opisani u nastavku sprovode se istovremeno tokom manipulacije.

IgG Imunoblot

Test se sastoji od odvojene inkubacije, **sa 2 susedne trake iz istog transfera**, dva uzorka (seruma ili očne vodice) za koje je poželjno poređenje imunoloških profila.

- 1. korak: Svaki uzorak seruma (ili očne vodice) koji se testira odvojeno se inkubira trakom. Specifična antitela potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vezuju za antigene.
- Korak 2: Alkalna fosfataza-**anti humani IgG** konjugat se zatim vezuje za vezana anti-antitela.
- Korak 3: Imunokompleksi reaguju sa supstratom. Antigeni koje prepoznaju specifična antitela **klase IgG prisutni** u uzorcima otkrivaju se kao ljubičaste poprečne trake.

IgM imunoblot

Princip testa je identičan, ali u koraku 2 prethodni konjugat je zamenjen alkalnom fosfatazom-**anti-humanim IgM** konjugatom. Razvoj boja će stoga otkriti antigene trake prepoznate od strane specifičnih antitela **IgM klase** prisutnih u uzorcima.

Čitanje

Sukcesivno poređenje parova IgG, a zatim IgM traka omogućava da se pokaže potencijalno prisustvo Traka boja koje su razvijene samo od strane jednog od uzoraka, a ne drugog (cf. § Tumačenje).

ISPORUČENI REAGENSI

Podrazumevano: paket od 24 testa (#TOP-VB24GM)

Kurziv: paket od 12 testova (#TOP-WB12GM) – **Bold**: paket od **96 testova** (#TOP-WB96GM)

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.
R3	1	Bočica (e) od 30 (30, 60) mL ANTI IgG KONJUGATE (Spreman za upotrebu – plavi rastvor).	Pufer + anti-humani IgG poliklonski kozji serumi konjugirani sa alkalnom fosfatazom + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizatori.
R4	1	Bočica (e) od 30 (30, 60) mL ANTI-IgM KONJUGATE (spreman za upotrebu - žuto rešenje).	Pufer + poliklonski kozji anti-humani IgM serum konjugiran na alkalnu fosfatazu + 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 (<u>Da se razblaži 10 puta</u> u destilovanoj vodi - bezbojan rastvor).	Pufer + surfaktant + NaN ₃ (<0,1%).

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

R2, R3, R4, R5 i R6 su zajednički za sve komplete i imaju jedinstven broj partije 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.**

R3, R4, (NaN₃): EUH 032 - Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksični 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, 25 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 reagensa 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 zamućene 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.
- 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 ispiranje, 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 ispiranje.
- 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.

PRIKUPLJANJE UZORAKA

Aseptički prikupiti uzorke u suvim epruvetama. Potrebno je najmanje 35 µL seruma ili 10 µL očne vodice. U slučajevima očne vodice, korišćenje 25 µL će povećati osetljivost testa (vidi § Postupak ispitivanja).

Držite uzorke na 2-8 ° C dok se ne obrade. Ako je potrebno čuvanje duže od nedelju dana, zamrznite 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 dejonizovane 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 uzoraka.

Strogo je obavezno uporediti par uzoraka sa spojenim trakama (susedni brojevi) iz datog prenosa (isti serijski broj). 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).

2. Odrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suvog ravnog prozirnog ravnala, zadržavajući plavu liniju pozicioniranja na trakama: držite trake čvrsto na mestu lenjirom i izrežite ih sa strane napreznja (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. Izdvojite uzorke u skladu sa utvrđenim planom distribucije (korak 1) i sledećim količinama:

	Serum	Očna vodica
IgG	10µL	10 ili 25µL
IgM	25µL	-

U slučajevima očne vodice, upotreba 25 µL će povećati osetljivost testa. 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, prema utvrđenom planu distribucije, 1.2 mL anti-IgG konjugata (R3) ili 1.2 mL anti-IgM konjugata (R4) u svakom od odgovarajućih bunara. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 60 minuta ± 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 ± 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 ispirana ima fundamentalni uticaj na obojenost pozadine). Imajte na umu da će trake olakšati dok se suše.

- Bitno je istovremeno zaustaviti razvoj boje 2 trake datog para za datu pod-klasu antitela, ali se može nezavisno zaustaviti da od IgG ili IgM (IgM, u nižoj koncentraciji, obično razvijaju sporije od IgG).
- Dečiji serum generalno ima nižu koncentraciju IgM. Reakcija mora imati vremena da se pravilno razvije i ne treba biti zabrinut da vidi majke IgM traka potamni malo više.
- Očna vodica generalno ima nižu koncentraciju antitela. Reakcija mora imati vremena da se pravilno razvije i ne treba biti zabrinut da vidi serumske trake potamne malo više.

10. Zaustavite reakciju aspiracijom supstrata sa Pasterovom pipetom ili okretanjem kadice za inkubaciju i doziranjem 2 ml destilovane ili dejonizovane vode u kanalima. Ponovite ovaj poslednji korak ispiranja 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 prozirnom lepljivom trakom.

Podudaranje, rame uz rame, IgG i IgM trake svakog para uzoraka u redosledu povećanja broja, prateći utvrđeni plan distribucije (korak 1).

Strogo je obavezno uporediti par uzoraka sa spojenim trakama (susedni brojevi) iz datog prenosa (isti serijski broj). 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

Opis traka

Pozitivan uzorak može predstaviti značajan broj opsega koji se nalaze između 15 i 200 kDa. Samo trake sa molekulskom težinom manjom od 120 kDa mogu se koristiti za poređenje profila.

Tumačenje

CIP-WB G+M (kongenitalna toksoplazmoza)

- Po rođenju (parovi majka / dete):

Nezavisno uporedite IgG trake i IgM trake. Pročitajte 2 susedne trake istovremeno od vrha do dna, uz napomenu bilo koji antigenska traka koji je **prisutan** u krvi pupčane vrpce **i odsutan** iz majčinog seruma.

Svaka traka koja ima dobro definisanu rezoluciju, molekularnu težinu (MW) manju od 120 kDa i koja je *prisutna samo kod deteta* je dokaz da je dete sintetiziralo antitela protiv toksoplazme, što ukazuje na kongenitalnu toksoplazmozu.

- Tokom postnatalnog monitoringa (dete D0 / dete D + N parovi):

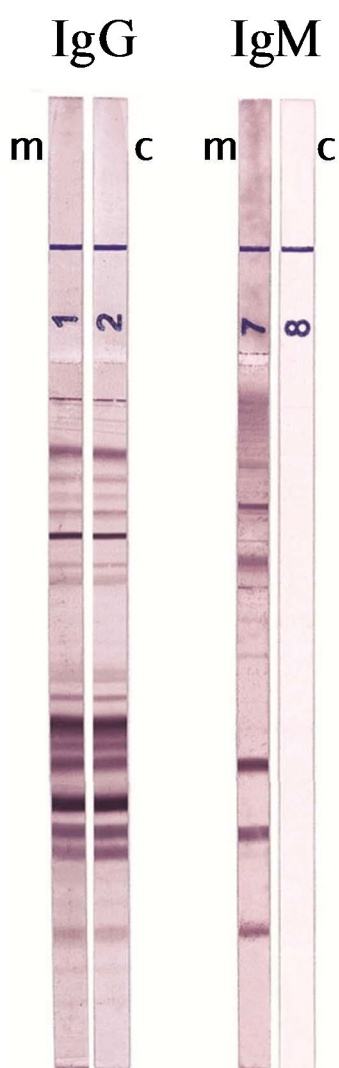
Nezavisno uporedite IgG trake i IgM trake. Pročitajte 2 susedne trake istovremeno od vrha do dna, uz napomenu bilo koji antigenski pojas koji je **prisutan** u serumu na D + N **i odsutan** iz krvi pupčane vrpce.

Svaka traka koji ima dobro definisanu rezoluciju, MW < 120 kDa i koji je *prisutan samo na D + N* je dokaz da je dete sintetiziralo anti-toksoplazma antitela, što ukazuje na kongenitalnu toksoplazmozu.

Napomena: indikacija CIP-WB IgG / IGM u postnatalnom monitoringu je namerno ograničena na 3 meseca za IgG i 1 mesec za IgM.

Napomena: Jukstapozicija obojenog standarda molekulske težine (fascikla R1) omogućava da se proceni MW razvijenih antigenskih traka (mora se prethodno smanjiti sa lenjirom i skalpelom, kao obična traka, i rukovati pincetom).

A. NEGATIVAN CIP (nezaraženo dete)



B. POZITIVAN CIP (zaraženo dete)

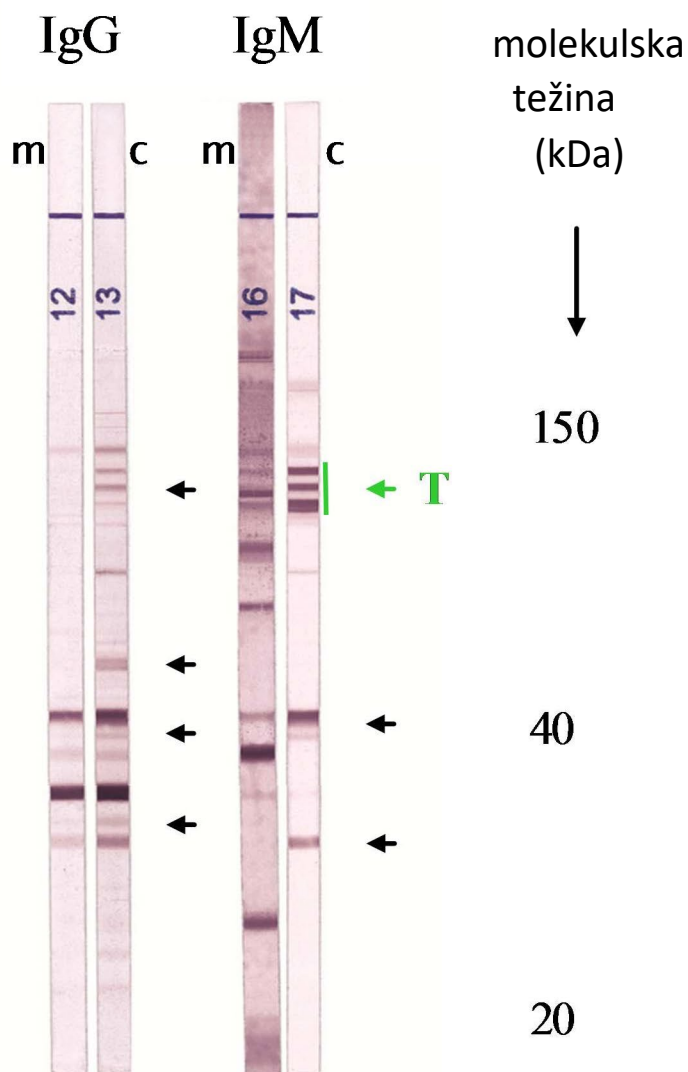


Fig. 1: Kongenitalna toksoplazmoza - Primeri pozitivnih i negativnih rezultata – (m = majka; c = dete)

Profili su dati kao primeri. **Trake su označene slovom "A" specifičnim za parametar iz serije "00011".**

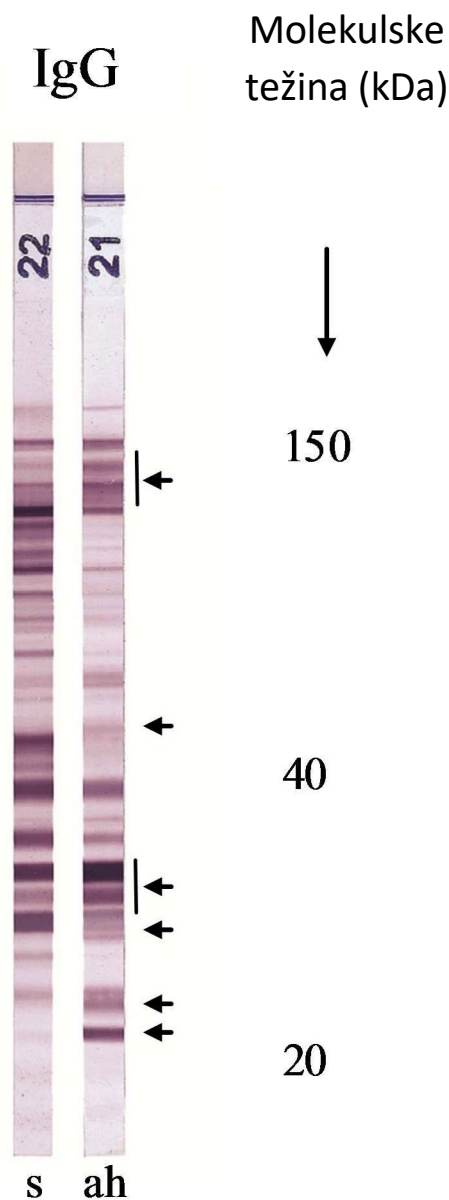
Par majka-dete (A) odgovara majci koja je zaražena tokom trudnoće, ali čije je dete nezaraženo: IgG profili su strogo identični (prenose se IgG); ne postoji drugi dodatni opseg prisutan na IgG i / ili IgM trakama deteta: **CIP-WB JE NEGATIVAN.**

Par (B), kongenitalna toksoplazmoza, odgovara majci zaraženoj tokom trudnoće i čije je dete takođe zaraženo. Pored prenesenih antitela, savršeno se primećuje prisustvo dodatnih traka (←), za IgG i / ili IgM, na trakama deteta, koje odgovaraju antitelima koja je dete novo sintetiziralo: **CIP-WB JE POZITIVAN**.

CIP-WB IgG (okularna toksoplazmoza)

Pročitajte 2 susedne trake istovremeno od vrha do dna uz napomenu bilo koja antigenska traka **prisutna** u očnoj vodici **i odsutna** iz seruma.

Bilo koja traka koji ima dobro definisanu rezoluciju, molekulsku težinu (MW) manju od 120 kDa i koja je *prisutna samo u očnoj vodici* dokazuje lokalnu sintezu anti-toksoplazma antitela, što ukazuje na očnu toksoplazmozu.



Sl. 2: Okularna toksoplazmoza - Primer pozitivnog rezultata – (s = serum; ah = očna vodica)

Profili su dati kao primeri. **Trake su označene slovom "A" specifičnim za parametar iz serije "00011".**

Veoma važne tačke

1. Rezultati CIP-WB IgG / IgM moraju se tumačiti u svetlu drugih kliničkih, seroloških, parazitoloških, epidemioloških i medicinskih informacija o snimanju kako bi se uspostavila dijagnoza kongenitalne ili očne toksoplazmoze.
2. Negativan rezultat CIP-WB IgG / IgM ne isključuje dijagnozu kongenitalne ili očne toksoplazmoze. Ovi pacijenti se uvek moraju pratiti tokom vremena dok se dijagnoza toksoplazmoze ne može definitivno potvrditi ili isključiti.
3. Aspekti traka mogu se uveliko razlikovati: uske, debele, manje ili više obojene, intenzivne, itd.
Kada se preuzme ova tehnika, preporučuje se da se napravi nekoliko poređenja profila sa poznatim parovima uzoraka kako bi se upoznali sa njihovim čitanjem.
Na početku se takođe preporučuje da CIP-WB čitanje obavljaju nezavisno dve osobe u laboratoriji. U slučaju neskladnih tumačenja, mora se izvršiti kontrolni CIP-WB.
4. Veoma visoke MW antigenske frakcije su veoma blizu zajedno u gornjem delu trake u korist bolje rezolucije srednjih i niskih MW frakcija. Opseg MW > 120 kDa stoga ne može da se koristi za tumačenje testa: uzorci samo koji predstavljaju takve razlike u profilu ne mogu se vratiti kao pozitivni.
5. Nasuprot tome (kongenitalna toksoplazmoza), "triplet" (tri vrlo lako prepoznatljive trake) koje se nalaze između 75 i 100 kDa se vrlo često nalaze na pozitivnim CIP-WB IgMs (vidi "T" *Sl. 1*, traka br. 17 desno).
6. Prilikom rođenja (kongenitalna toksoplazmoza), mora se obratiti posebna pažnja na bilo kakvo opšte pojačanje intenziteta traka (hemokoncentracija) koje bi mogle ukazivati na to da u krvi pupčane vrpce postoje dodatne trake. Serumi koji samo predstavljaju takve razlike u profilu se vraćaju kao negativni.
7. Nasuprot tome (kongenitalna toksoplazmoza, očna toksoplazmoza), značajno pojačanje (često u širini i intenzitetu) jednog ili dva izolovana opsega, dok su sve ostale trake identičnog ili slabijeg intenziteta, smatra se kriterijumom za pozitivnost.
8. Prirodna antitela (kongenitalna toksoplazmoza):
Tehnika imunoblota je izuzetno osetljiva, a antigen koji se koristi za CIP-WB test izabran je za mnoštvo antigenskih traka prisutnih na traci.
Brojne publikacije pominju trake koje je razvio imunoblot kod osoba koje očigledno nikada nisu imale toksoplazmozu. Ova antitela (IgG i IgM) se retko otkrivaju drugim tehnikama, ali se vrlo često otkrivaju imunoblotom. Oni mogu biti posledica unakrsnih reakcija sa antitelima usmerenim protiv imunogena prirode koja tek treba da se utvrdi.
Zbog toga je indikacija za **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** test rezervisana za upoređivanje profila. (Da biste potvrdili IgG serologije, koristite specifične **LDBIO TOXO II IgG** test koji je namenjen za tu upotrebu)
Novorođenčad ne predstavljaju prirodna antitela (osim prenosivih majčinih antitela), ali verovatnoća pojavljivanja prirodnih antitela povećava se sa uzrastom deteta nakon 3 meseca; oni se retko nalaze između 3 i 6 meseci.
Zbog toga je indikacija za CIP-WB IgG / IgM u postnatalnom monitoringu namerno ograničena na 3 meseca za IgG i 1 mesec za IgM: nespecifične trake se u stvari pojavljuju ranije za IgM.
9. "Toplotni šok proteina" (kongenitalna toksoplazmoza):
Nespecifični, uski opseg slabog ali promenljivog intenziteta može biti prisutan za IgM do 37 kDa. To je artefakt povezan sa pripremom antigena i nazvan "Protein toplotnog šoka". Prisutan na obe trake para majka-dete, ponekad se može činiti izraženijim sa određenim serumima tokom praćenja deteta. Ne uzimajte ovu traku u obzir.
10. CIP-WB (očna toksoplazmoza): CIP-WB IgM nije od koristi u dijagnostici očne toksoplazmoze. Međutim, CIP-IgA je od dijagnostičkog interesa u toj situaciji. Za više informacija o CIP-IgA, kontaktirajte nas.

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 P24)

Ove studije su sprovele nezavisne referentne laboratorije.

CIP-WB G+M: Kongenitalna toksoplazmoza pri rođenju (majka / dete)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZ	NEG
KLINIČKI PODACI	POZ CT n = 54	41	13
	NEG CT n = 60	0	60

Tabela 1: Performanse CIP-WB IgG / IgM pri rođenju (n = 114)

Specifičnost = 100%

Pozitivna prediktivna vrednost = 100%

Osetljivost = 76%

Negativna prediktivna vrednost = 83%

CIP-WB G+M: Kongenitalna toksoplazmoza u postnatalnom monitoringu (dete D0 / D20)

Od 54 dece koja su prethodno testirana na D0 (**Tabela 1**), 10 nezaražene dece i 12 zaražene dece (n = 22) praćeno je do D20 i retrospektivno analizirano **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** testom.

- **U D0:** 4 od 12 zaražene dece nije imalo profil drugačiji od rođenja (lažno negativni).
- **Na D20:** 1 jedno dete ostaje negativno.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZ	NEG
KLINIČKI PODACI	POZ CT n = 12	11	1
	NEG CT n = 10	0	10

Tabela 2: Performanse CIP-WB IgG / IgM na D20 (n = 22)

Specifičnost = 100%

Pozitivna prediktivna vrednost = 100%

Osetljivost = 92%

Negativna prediktivna vrednost = 91%

CIP-WB IgG: Očna toksoplazmoza (serum / očna vodica)

Predstave prikazane u nastavku su iz meta-analize četiri studije objavljene od strane referentnih centara.

Ove studije upoređuju performanse CIP-WB **IgG** sa onima Goldmanovog Witmerovog koeficijenta (GWC) i PCR-a. Oni takođe pokazuju dijagnostičke performanse dobijene kombinovanom asocijacijom dve ili tri od ovih tehnika.

Sve ove četiri studije koristile su LDBIO test u skladu sa preporukama u uputstvima za upotrebu kompleta.

Osetljivost je određena na 113 pacijenata sa klinički dokazanom očnom toksoplazmozom. Specifičnost je izračunata na kontrolnoj populaciji koja predstavlja očno stanje osim toksoplazmatske infekcije: očna toksokarioza (n = 5), virusna infekcija (n = 10), druge infekcije (n = 4), neinfektivna očna stanja (n = 126) od kojih katarakta (n = 42).

Osetljivost (Se)

Ukupna osetljivost CIP-WB IgG je **62,8%** (n = 113), performanse koje su uporedive sa GWC (Se = 61,0%, n = 113) i veće od PCR (Se = 43,5%, n = 92, p = 0,0028).

Kombinacija CIP-WB sa GWC i PCR poboljšava osetljivost dijagnoze:

CIP-WB + GWC: Se = 78.1% (n=96, p=0.0082)

CIP-WB + GWC + PCR: 86.3% (n=95, p=0.0001)

Specifičnost (Sp)

Ukupna specifičnost CIP-WB IgG je **92,8%** (n = 111), performanse koje su uporedive sa GWC (Sp = 94,2%, n = 139) i manje od PCR (Sp = 100%, n = 131, p = 0,0009).

Kombinacija ove dve tehnike, CIP-WB IgG + GWC, neznajno smanjuje specifičnost dijagnoze (Sp = 91,1%, n = 101, p = 0,32). Kombinacija sa PCR ne utiče na specifičnost.

Zaključak

Imunotest **Toxoplasma WB IgG IgM** ima odlične performanse u dijagnostici kongenitalne ili očne toksoplazmoze.

Kod kongenitalne toksoplazmoze, CIP-WB G+M ima osetljivost od **76%** [95CI 62-86%] i specifičnost od **100%** [95CI 92-100%] pri rođenju. Ponovno testiranje u prvom mesecu života dodatno povećava osetljivost CIP-WB G+M.

Kod očne toksoplazmoze, CIP-WB IgG ima osetljivost od **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] i specifičnost od **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Kombinacija sa drugim tehnikama (GWC i / ili PCR) povećava dijagnostičke performanse.

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 reagensa i nije pravilno inkubirala duž cele dužine. Mrlje boje mogu biti prisutne i tamo gde je uzorak deponovan ako poslužavnik nije uzdrman nakon doziranja.

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

Ovaj nespecifičan 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

- 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).

OBAVEŠTENJE AŽURIRANJA – Molimo vas da pažljivo pročitate

DATUM IZLASKA	VERZIJA	REZIME MODIFIKACIJE
26/07/2021	Vs18	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - Kontakt adresa e-pošte – NaN ₃ EUH 032
25/07/2022	Vs19	R6 bez NaN ₃ . Traka identifikovana slovom A. Moguća upotreba reagensa iz različitih serija.
30/11/2022	Vs20	Nova adresa



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