

TOXOPLASMA

CE0459



Western Blot IgG IgM

In vitro diagnostični imunoblotski test
Polavtomatska / ročna tehnika

#TOP-WB24GM: 24 testov

#TOP-WB12GM: 12 testov

#TOP-WB96GM: 96 testov

NAVODILA ZA UPORABO

Poiščite več informacij in navodila za uporabo v svojem jeziku na naši spletni strani
www.ldbiodiagnostics.com

PREDVIDENA UPORABA

TOXOPLASMA WB IgG-IgM je imunoblot test za enkratno uporabo za primerjavo imunskih profilov (CIP-WB) za protitelesa IgG in IgM, ki je namenjen diagnozi naslednjih stanj:

- Kongenitalna toksoplazmoza ob rojstvu (D0): CIP-WB G+M med materino krvjo in popkovnično krvjo.
- Kongenitalna toksoplazmoza ob poporodnem spremljanju (D+N): CIP-WB G+M med popkovnično krvjo na D0 in otrokovo krvjo pri D+N.
- Očesna toksoplazmoza: CIP-WB IgG med bolnikovim serumom in prekatno vodico.

Ta test ni namenjen presejanju ali potrjevanju izoliranih serologij. V ta namen uporabite test **LDBIO TOXO II IgG** (ref. TOXO II IgG WB).

NAČELO TESTA

Western Blot tehnika

Z elektroforezo ločeni antigeni parazita *Toxoplasma gondii* se preko električnega blotinga vežejo na površino nitrocelulozne membrane (t.i. prenos), ki je razrezana na 24 trakov, oštevilčenih od 1 do 24.

Izvedba testa

Opomba: Spodaj opisani imunoblot testi protiteles IgG in IgM se med rokovanjem izvajajo istočasno.

IgG imunoblot

Test vključuje ločeno inkubacijo z **2 sosednjima trakovoma iz istega prenosa**, oba vzorca (serumov ali prekatne vodice) za želeno primerjavo imunoloških profilov.

- Korak 1: Vsak vzorec s serumi (ali prekatno vodico) za individualno testiranje je ločeno inkubiran s trakom. Protitelesa proti-*Toxoplasma*, ki so lahko prisotna v vzorcu, se selektivno vežejo na antigene *T. gondii*.
- Korak 2: Konjugat alkalna fosfataza-**proti človeški IgG** se nato veže na vezana protitelesa.
- Korak 3: Imunokompleksi reagirajo s substratom. Antigeni, ki jih prepoznajo protitelesa proti *toksoplazmi razreda IgG*, prisotna v vzorcih, se pokažejo kot vijolične prečne črte.

IgM imunoblot

Načelo testa je isto, vendar se pri 2. koraku prejšnji konjugat zamenja s konjugatom alkalna fosfataza-**proti človeški IgM**. Razvoj barve torej pokaže, katere antigenske črte so prepoznala protitelesa proti-*Toxoplasma razreda IgM*, ki so prisotna v vzorcih.

Odčitek

Zaporedna primerjava parov trakov IgG in nato IgM pokaže morebitno prisotnost črt, ki so se razvile samo pri enem od vzorcev, pri drugem pa ne (prim. § Interpretacija).

Reagenti so vključeni v komplet

Privzeto: paket 24 testov (#TOP-WB24GM)

ležeče: paket 12 testov (#TOP-WB12GM) – Krepko: Paket 96 testov (#TOP-WB96GM).

ID	Količina	Opis	Sestava
R1	1	Mapa/mape s 24 (12, 4 x 24) TRAKOVI: razrezani + obarvani, standardni. (Vsaka mapa in vsak prenos ima enkratno identifikacijsko serijsko številko)	Senzibilizirana nitroceluloza. Obarvana molekulska masa (kDa): Modra: 250, modra: 150, modra: 100, rožnata: 75, modra: 50, zelena: 37, rožnata: 25, modra: 20, modra: 15.
R2	1	Viala s 30 (30, 125) ml VZORČNEGA PUFRA (pripravljen za uporabo – rožnata raztopina).	Pufer + površinsko aktivna snov.
R3	1	Viala/viale s 30 (30, 60) ml KONJUGATA PROTI IgG (pripravljen za uporabo – modra raztopina).	Pufer + poliklonalni serumi kozjega izvora s proti človeškim IgG, konjugirani z alkalno fosfatazo + NaN ₃ (< 0,1 %) + stabilizatorji.
R4	1	Viala/viale s 30 (30, 60) ml KONJUGATA PROTI IgM (pripravljen za uporabo – rumena raztopina).	Pufer + poliklonalni serumi kozjega izvora s proti človeškim IgM, konjugirani z alkalno fosfatazo + NaN ₃ (< 0,1 %) + stabilizatorji.
R5	1	Viala s 30 (30, 125) ml SUBSTRATA (pripravljen za uporabo – motno rjava viala).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatorji.
R6	1	Viala s 60 (60, 250) ml 10-KRATNI KONCENTRAT PUFRA ZA PRANJE (10-krat ga razredčite v destilirani vodi – brezbarvna raztopina).	Pufer + površinsko aktivna snov.

R1: Črka pred vsako številko traku je značilna za parameter.

R2, R3, R4, R5 in R6 so skupni vsem kompletom in imajo enkratno serijsko številko, ki je odvisna od datuma njihove proizvodnje. **Priporočamo, da z namenom omejitve števila odprtih vial in zagotavljanja boljšega nadzora kakovosti izvedete večparametrsko testiranje (glejte LDBIO obseg imunoblot testa).**

R3, R4 (NaN₃): EUH 032 - V stiku s kislinami se sprošča zelo strupen plin.

EUH 210 Varnosti list na voljo na zahtevo in na naši spletni strani www.ldbiodiagnostics.com.

ZAHTEVANI SO DODATNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Večkanalni inkubacijski pladnji iz polipropilena za mini blot teste (# WBPP- 08 ali enakovredno).
- Stresalna plošča za imunoblot teste, vakuumski sistem za tekočine (priložene kadi # WBPP- 08 lahko preprosto izpraznite tako, da jih preobrnete).
- Epruvete in materiali za odvzem vzorcev, jeklenke, prilagojeni vsebniki. Samodejne pipete, mikropipete in konice za enkratno uporabo (prostornine 10 µL, 25 µl, 1,2 ml in 2 ml).
- Destilirana ali deionizirana voda. Vpojni papir (npr. Whatmanov filtrirni papir), prozoren lepilni trak.
- Rokavice, pinceta za ravnanje s trakovi, rezilo ali skalpel, prozorno ploščato ravnilo.

Opomba: Naše reagente je mogoče uporabljati v avtomatskem procesorju za izvedbo imunoblot testov. **Če v procesorju hkrati uporabljate reagente drugih proizvajalcev, pazite, da ne pride do kemične ali bakterijske kontaminacije naših reagentov** (znan primer: kontaminacija s TWEEN 20). Za procesor rezervirajte posebne vial. Po obdelavi uporabljenih reagentov ne shranjujte v izvirne vial.

HRAMBA IN STABILNOST

Hranite med 2 in 8 °C. Reagenti iz kompleta so stabilni do roka trajanja, ki je naveden na zunanem delu škatle in na oznakah na vialah. Ne uporabljajte kontaminiranega ali motnega reagenta. Pufer za pranje, razredčen na 1/10, je stabilen 2 meseca pri temperaturi od +2 do +8 °C ter en teden pri sobni temperaturi.

PREVIDNOSTNI UKREPI PRI UPORABI

Varnost

- Samo za uporabo *in vitro*. Samo za profesionalno uporabo. Samo za tehnično usposobljeno osebje. S snovmi ravnajte v skladu z Dobrimi laboratorijskimi praksami ter upoštevajte, da je vsak reagent in vsak vzorec lahko strupen in/ali kužen.
- Nosite laboratorijsko haljo, rokavice in zaščitna očala: v laboratoriju ne pijte, jejte ali kadite. Tekočin iz pipet ne prelivajte z usti.
- Substrat vsebuje mešanico NBT in BCIP ter je strupen ob stiku (s kožo in sluznicami) in ob vdihavanju.
- Reagenti vsebujejo natrijev azid, ki lahko s svincem in bakrom tvori eksplozivne kovinske soli. Če polijete katero koli izmed snovi, jo izperite z vodo.
- Odpadke (vzorci, konice, epruvete, tekočino za pranje, rabljene reagente idr.) zavržite v skladu z dobrimi sektorskimi praksami in aktualnimi predpisi, ki veljajo v državi.
- Vsak resen incident mora biti predmet prijave proizvajalcu in pristojnemu organu.

Previdnostni ukrepi

- Rezultate preberite in interpretirajte pod direktno belo svetlobo.
- Zaželeno je, da uporabite vse reagente iz iste serije. Če uporabljate različne serije, zagotovite sledljivost.
- Trakove uporabljajte v številčnem zaporedju. Ne mešajte trakov z različnimi serijskimi številkami; prenose uporabite enega za drugim. Pred začetkom testiranja določite specifičen načrt distribucije.
- Trakov se ne dotikajte s prsti – uporabite pinceto.
- Reagente pred uporabo dobro premešajte, zlasti koncentrirani pufer za pranje.
- Vial po uporabi zamašite; ne uporabljajte jih, če je bila v reagente pomotoma vnešena snov. Ne uporabljajte reagenta iz vial, ki kaže znake puščanja. Ne uporabljajte motne ali oborjene raztopine.
- Uporabljajte zgolj konice pipet za enkratno uporabo. Preprečite vsakršno kontaminacijo med kanali. Prepričajte se, da se na konicah pipet ne delajo pena ali mehurčki (bakterijska kontaminacija vial z reagenti).
- Inkubacijske pladnje čistite samo z destilirano vodo (nikoli z detergentom ali belilom).
- Če spustite vzorec ali razdelite neprimerno količino, lahko rezultat negativnega ali pozitivnega testa, ne glede na njegovo dejansko stanje.

ODVZEM VZORCEV

Vzorke aseptično odvzemite v suhe epruvete. Potrebovali boste najmanj 35 µl seruma ali 10 µl prekatne vodice. V primeru prekatne vodice bo odzem 25 µl povečal občutljivost testa (Oglejte si § Postopek izvedbe testa).

Do obdelave hranite vzorce pri temperaturi 2–8 °C. Če je treba vzorce hraniti več kot en teden, zamrznite pri -20 ± 5 °C. Ne uporabljajte kontaminiranih vzorcev. Izogibajte se večkratnemu zamrzovanju in odmrzovanju vzorcev.

Čeprav pri hemoliziranem, zlateničnem ali lipidnem serumu ni bila opažena nikakršna navzkrižna reakcija, pri rezultatih uporabe tovrstnih vzorcev svetujemo skrbno interpretacijo.

PRIPRAVA REAGENTOV

Pufer za pranje: Za 4 teste v čisti posodi 10-krat razredčite 10 ml koncentrata za pranje (R6) v 90 ml destilirane ali deionizirane vode. Pazite, da razredčeni pufer dobro premešate.

POSTOPEK IZVEDBE TESTA

Zapomnite si: Priporočamo, da z namenom omejitve števila odprtih vial in zagotavljanja boljšega nadzora kakovosti izvedete večparametrsko testiranje (glejte LDBIO obseg imunoblot testa).

1. Pripravite načrt razporeditve vzorcev.

Pri primerjavi vzorcev iz istega prenosa (z isto serijsko številko) morate obvezno izbrati vzorca s povezanima trakovima (s sosednjima številkami). Primerjava trakov, ki so nameščeni daleč stran drug od drugega (npr. trak št. 2 in trak št. 15), ni zanesljiva. Primerjava trakov iz različnih kompletov (z različnimi serijskimi številkami) **je nevarna** (prikažejo se lahko lažni rezultati).

2. Zahtevano število trakov (R1) izrežite s skalpelom ter čistim in suhim ploskim, prozornim ravnilom, pri čemer modro pozicijsko črto držite na trakovih: s pomočjo ravnila trakove trdno pridržite na mestu in jih odrežite na strani upogiba (številke lahko vidite skozi ravnilo).
3. V vsak kanal vnesite 1,2 ml vzorčnega pufra (R2) v skladu z načrtom.
4. Oštevilčene trakove po številčnem redu položite v kanale: dovolite, da se trakovi sami rehidrirajo na površini pufra približno 1 minuto, pri čemer naj bodo njihove številke vidne na vrhu, NATO nežno stresite pladenj in zagotovite, da se trakovi popolnoma potopijo v pufer.
5. Vzorce razporedite glede na sprejeti načrt (1. korak) in v naslednjih količinah:

	Serum	Prekatna vodica
IgG	10 µl	10 ali 25 µl
IgM	25 µl	-

V primeru prekatne vodice bo odzem 25 µl povečal občutljivost testa.
Po vsakem vnosu nežno stresite pladenj. Pladenj položite na stresalno ploščo.

Inkubirajte 90 min. ± 5 min. pri 20-26 °C.

6. Pranje: Vsebinsko kanalov odstranite s Pasteurjevo pipeto ali tako, da preobrnete inkubacijski pladenj. V vsak kanal vnesite 2 do 3 ml razredčenega pufra za pranje. Na stresalni plošči inkubirajte 3 minute. Ponovite 2-krat in izpraznite kanale. Pazite, da se pri izvajanju teh korakov trakovi ne obračajo.
7. 1,2 ml konjugata proti IgG (R3) ali 1,2 ml konjugata proti IgM (R4) v skladu s sprejetim načrtom razporedite v ustrezne kanalne plošče. Pladenj položite na stresalno ploščo.

Inkubirajte 60 min. ± 5 min. pri 20-26 °C

8. Pranje: ponovite 6. korak.
9. V vsak kanal vnesite 1,2 ml substrata NBT/BCIP (R5). Pladenj položite na stresalno ploščo in ga zaščitite pred neposredno svetlobo. **Inkubirajte 60 min. ± 5 min. pri 20-26 °C.**

Spremljajte spreminjanje barve ne glede na parametre. Spreminjanje barve lahko ustavite, če barva ozadja na traku potemni do točke, ki oteži odčitavanje (kakovost pranja ključno vpliva na obarvanje ozadja). Upoštevajte, da bodo med sušenjem trakovi postali svetlejši.

- Ključno je, da pri paru vzorcev za določen podrazred protiteles istočasno ustavite razvoj barv na obeh trakovih, medtem ko lahko pri protitelesih IgG ali IgM razvoj barv ustavite posamično (barve se pri protitelesih IgM pri nižji koncentraciji navadno razvijejo počasneje kot pri IgG).
- Koncentracija IgM v otroškem serumu je praviloma nižja. Za ustrezen razvoj reakcije dopustite dovolj časa. Temnejše obarvanje traku z materinim IgM je običajen pojav.
- Koncentracija protiteles v prekatni vodici je praviloma nižja. Za ustrezen razvoj reakcije dopustite dovolj časa. Temnejše obarvanje trakom s serumom je običajen pojav.

10. Reakcijo ustavite z aspiracijo substrata s Pasteurjevo pipeto ali tako, da preobrnete inkubacijsko kad, ter v kanale vlijete 2 ml destilirane vode. Zadnji korak pranja ponovite še enkrat.
11. Sušenje trakov: Ko je v kanalih še voda, s pinceto zgrabite trakove na oštevilčenem koncu in jih položite na Whatmanov filtrirni papir tako, da številka ostane vidna. Pustite, naj se posušijo na zraku. Med sušenjem bodo trakovi naravno postali svetlejši. Trakove lahko interpretirate šele, ko se popolnoma posušijo.
12. Hramba: Trakove prenesite na list papirja, ki bo uporabljen za arhiviranje. Poravnajte modre pozicijske črte. Držite jih na mestu s ploščatim ravnilom, zgornji del trakov prilepite s prozornim lepilnim trakom.

Trakova IgG in IgM iz vsakega para vzorcev položite drug ob drugega, in sicer od najnižje do najvišje številke, v skladu s sprejetim načrtom razporeditve (1. korak).

Pri primerjavi vzorcev iz istega prenosa (z isto serijsko številko) morate obvezno izbrati vzorca s povezanimi trakovoma (s sosednjima številčkama). Primerjava trakov, ki so nameščeni daleč stran drug od drugega (npr. trak št. 2 in trak št. 15), ni zanesljiva. Primerjava trakov iz različnih kompletov (z različnimi serijskimi številčkami) je **nevarna** (prikažejo se lahko lažni rezultati).

NADZOR KAKOVOSTI IN INTERPRETACIJA

Opis trakov

V primeru pozitivnega vzorca se lahko med 15 in 200 kDa prikaže veliko število črt. Za primerjavo profilov lahko uporabite le črte z molsko maso, nižjo od 120 kDa.

Interpretacija

CIP WB G+M (kongenitalna toksoplazmoza)

- Ob rojstvu (pari mati/otrok):

Ločeno primerjajte trakove IgG in IgM. Istočasno odčitajte rezultate 2 sosednjih trakov od zgoraj navzdol ter bodite pozorni na morebitne antigenske črte, ki so **prisotne** v popkovnični krvi **in odsotne** v materinem serumu.

Vsaka črta, ki je dobro ločljiva, ima molsko maso (MW) pod 120 kDa in je *prisotna samo pri otroku*, dokazuje, da ima otrok sintetizirana protitelesa proti toksoplazmozi, kar pomeni prisotnost kongenitalne toksoplazmoze.

- Med poporodnim spremljanjem (pari otrok D0/otrok D+N):

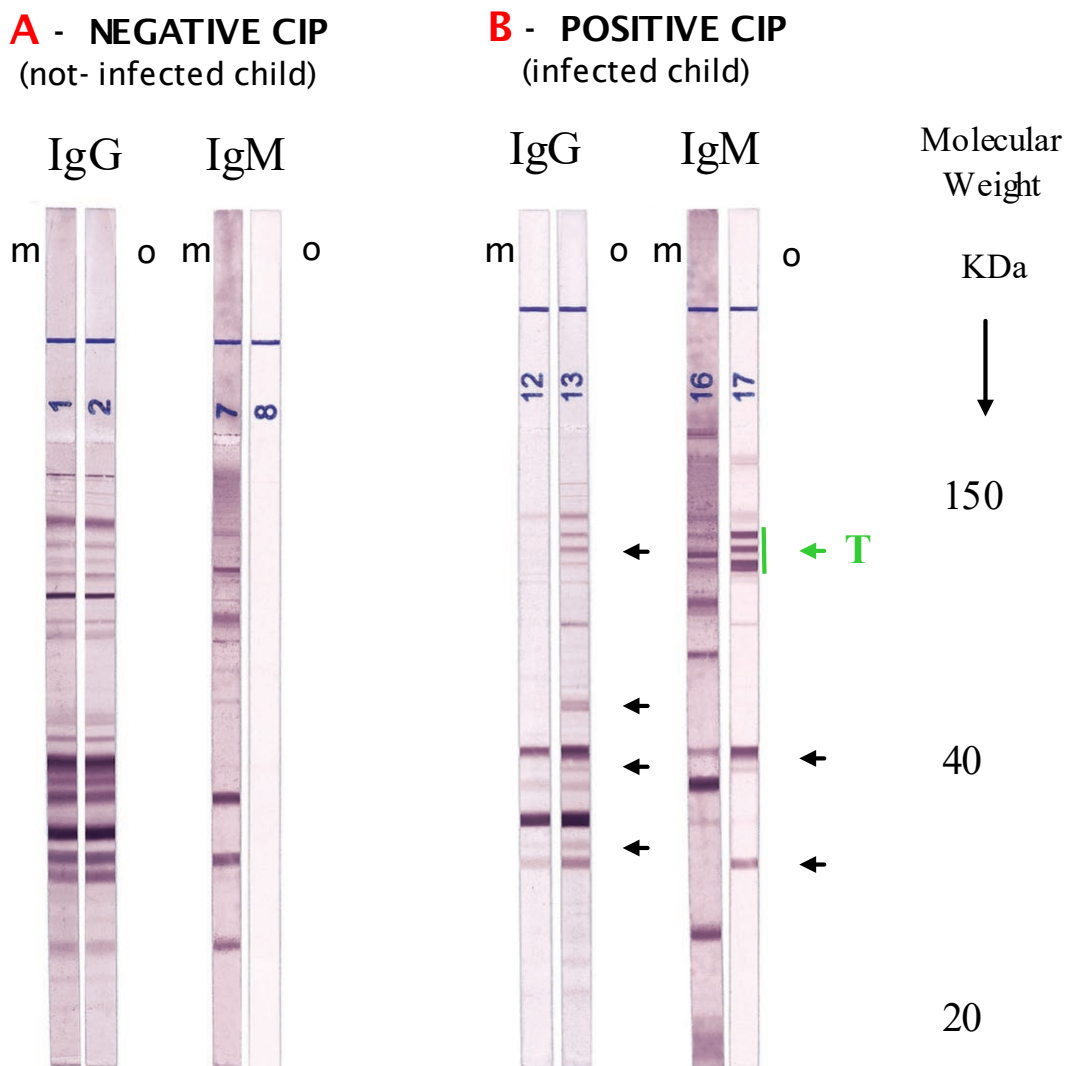
Ločeno primerjajte trakove IgG in IgM.

Istočasno odčitajte rezultate 2 sosednjih trakov od zgoraj navzdol ter bodite pozorni na morebitne antigenske črte, ki so **prisotne** v serumu pri D+N **in odsotne** v popkovnični krvi.

Vsaka črta, ki je dobro ločljiva, ima molsko maso < 120 kDa in je *prisotna samo pri D+N*, dokazuje, da ima otrok sintetizirana protitelesa proti toksoplazmozi, kar pomeni prisotnost kongenitalne toksoplazmoze.

Opomba: indikacija testa CIP-WB IgG/IGM pri poporodnem spremljanju je namenoma omejena na 3 mesece za IgG in 1 mesec za IgM.

Opombe: Postavitev obarvanega standarda molske mase (mapa R1) omogoča oceno molske mase razvitih antigenskih črt (kot navaden trak ga morate predhodno izrezati s pomočjo ravnila in skalpela ter ga premikati s pinceto).



Slika 1: Kongenitalna toksoplazmoza – primeri pozitivnih in negativnih rezultatov – (m=mati; o=otrok)

Profili so navedeni kot primeri. **Trakovi so označeni s črko "A", ki je značilna za parameter iz serije "00011".**

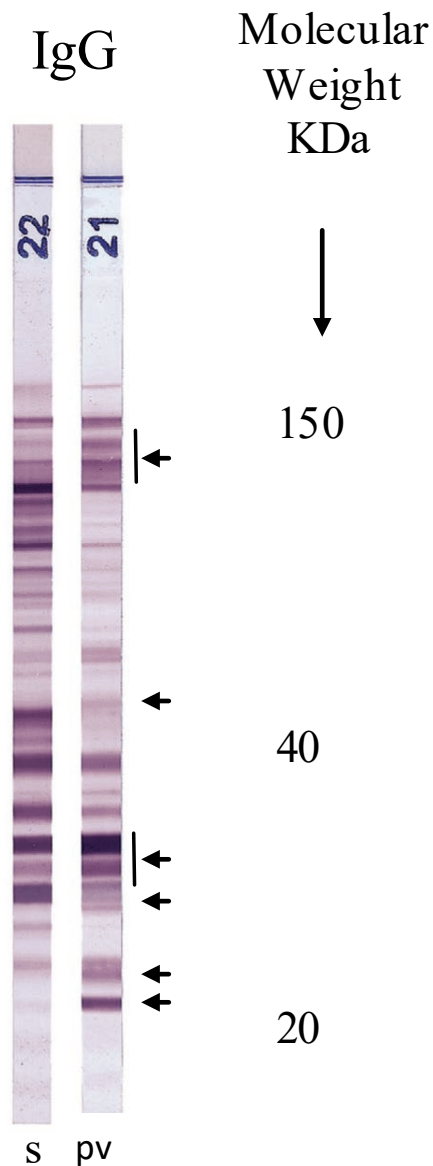
Par mati-otrok (A) ustreza materi, okuženi med nosečnostjo, katere otrok je neokužen: profila IgG sta popolnoma enaka (prenesena protitelesa IgG); na otrokovih trakovih IgG in/ali IgM ni dodatnih črt: **TEST CIP-WB JE NEGATIVEN**.

Par (B), kongenitalna toksoplazmoza, ustreza materi, okuženi med nosečnostjo, katere otrok je tudi okužen. Poleg prenesenih protiteles na otrokovih trakovih jasno opazimo prisotnost dodatnih črt (←) za IgG in/ali IgM, kar ustreza otrokovim novosintetiziranim protitelesom: **TEST CIP-WB JE POZITIVEN**.

CIP WB IgG (očesna toksoplazmoza)

Istočasno odčitajte rezultate 2 sosednjih trakov od zgoraj navzdol ter bodite pozorni na morebitne antigenske črte, ki so **prisotne** v prekatni vodici **in odsotne** v serumu.

Vsaka črta, ki je dobro ločljiva, ima molsko maso (MW) pod 120 kDa in je prisotna *samo v prekatni vodici*, dokazuje lokalno sintezo protiteles proti toksoplazmozi, kar pomeni prisotnost kongenitalne toksoplazmoze.



Slika 2: Očesna toksoplazmoza – primeri pozitivnih rezultatov – (s= serum; ah= prekate vodice)
Profili so navedeni kot primeri. **Trakovi so označeni s črko "A", ki je značilna za parameter iz serije "00011".**

Zelo pomembna dejstva

1. Rezultate testa CIP-WB IgG/IgM morate za pravilno diagnosticiranje kongenitalne ali očesne toksoplazmoze interpretirati ob upoštevanju drugih kliničnih, seroloških, parazitoloških in epidemioloških podatkov ter medicinskega slikovnega gradiva.
2. Negativen rezultat testa CIP-WB IgG/IgM ne izključuje diagnoze kongenitalne ali očesne toksoplazmoze. Bolnike morate vedno spremljati, dokler diagnoze toksoplazmoze ni mogoče dokončno potrditi ali ovreči.
3. Videz črt se lahko zelo razlikuje: lahko so ozke, debele, bolj ali manj obarvane, intenzivne itd. Pri uporabi te tehnike svetujemo izvedbo več primerjav profilov iz znanih parov vzorcev, s čimer se boste bolje seznanili z njihovim odčitavanjem.
Hkrati priporočamo, da na začetku odčitavanje rezultatov testa CIP-WB v laboratoriju ločeno izvajata dve osebi. V primeru neskladnih interpretacij izvedite kontrolni test CIP-WB.
4. Antigenske frakcije z zelo visoko molsko maso so navedene strnjeno na zgornjem delu traku za zagotavljanje boljše ločljivosti frakcij s srednjo in nižjo molsko maso. Črt z molsko maso > 120 kDa zato ne smete uporabiti za interpretacijo testov: vzorcev, pri katerih se pojavijo izključno tovrstne razlike profilov, ne smete označiti za pozitivne.
5. Nasprotno (pri kongenitalni toksoplazmozi) pa se „trojček“ oz. tri zlahka opazne črte med 75 in 100 kDa pogosto pojavijo na pozitivnih testih CIP-WB IgM (glejte „T“ **slika 1**, trak št. 17 na desni strani).
6. Ob rojstvu (pri kongenitalni toksoplazmozi) bodite posebej pozorni na morebitno povečano splošno intenzivnost črt (hemokoncentracijo), ki lahko pomeni prisotnost dodatnih črt v popkovnični krvi. Serumi, pri katerih se pojavijo samo tovrstne razlike profilov, veljajo za negativne.
7. Nasprotno (pri kongenitalni in očesni toksoplazmozi) veljata občutna okrepitev (pogosto povečanje širine in intenzivnosti) ene ali dveh izoliranih črt ter istočasna nespremenjena ali zmanjšana intenzivnost ostalih črt kot merilo pozitivnosti.
8. Naravna protitelesa (kongenitalna toksoplazmoza):
tehnika imunoblot je izjemno občutljiva, antigen, uporabljen pri testu CIP-WB, pa je bil izbran zaradi številnih antigenih črt, ki se pojavijo na traku.
Številne objave omenjajo črte, ki so se v imunoblot testu razvile pri posameznikih, ki se očitno nikoli niso okužili s toksoplazmozo. Medtem ko druge tehnike le redko prepoznajo ta protitelesa (IgG in IgM), jih imunoblot test zazna zelo pogosto. Pojavijo se lahko zaradi navzkrižnih reakcij s protitelesi, ki delujejo proti imunogenom še neznane narave.
Zato je uporaba testa **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** omejena na primerjavo profilov. (Za potrjevanje serologij IgG uporabite namenski specifični **LDBIO TOXO II IgG** test.)
Novorojenci nimajo naravnih protiteles (razen prenesenih materinih protiteles), vendar pa se verjetnost pojava naravnih protiteles povečuje po 3. mesecu starosti. Med 3. in 6. mesecem starosti jih zaznamo le redko.
Zato je indikacija testa CIP-WB IgG/IgM ob poporodnem spremljanju namenoma omejena na 3 mesece za IgG in 1 mesec za IgM: nespecifične črte za IgM se dejansko pojavijo bolj zgodaj.
9. „Heat Shock Protein“ (kongenitalna toksoplazmoza):
Pri IgM do 37 kDa se lahko pojavi nespecifična, ozka črta nizke, a spremenljive intenzivnosti. Gre za artefakt, povezan s pripravo antigena, imenujemo pa ga „Heat Shock Protein“. Pojavi se tako na materinih kot na otrokovih trakovih v parih, vendar pa je včasih lahko opaznejši v nekaterih serumih pri spremljanju otroka. Te črte ne upoštevajte.
10. CIP-WB (očesna toksoplazmoza): Test CIP-WB IgM pri diagnosticiranju očesne toksoplazmoze ni uporaben.
Vendar je CIP-IgA diagnostično zanimiv v tej situaciji. Za več informacij o CIP-IgA se obrnite na nas.

OMEJITVE UPORABE

- Diagnoze kužne bolezni ni mogoče postaviti na podlagi rezultatov enega samega testa.
- Serološki rezultati morajo biti za postavitev diagnoze interpretirani v skladu z razpoložljivimi podatki (npr. z epidemiološkega, kliničnega, biološkega področja, področja zajema slik itd.). Ne smemo jih uporabljati kot podlago za diagnozo samo na podlagi njihove pozitivnosti.

IZVEDBE (GLEJ REFERENCE LITERATURE Stran 11)

Te študije so bile izvedene v neodvisnih referenčnih laboratorijih.

CIP-WB G+M: KONGENITALNA TOKSOPLAZMOZA ob rojstvu (mati/otrok)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZ	NEG
KLINIČNI PODATKI	POZ CT n = 54	41	13
	NEG CT n = 60	0	60

Tabela 1: Izvedba testa CIP-WB IgG/IgM ob rojstvu (n = 114):

Specifičnost = 100 %

Občutljivost = 76 %

Pozitivna napovedna vrednost = 100 %

Negativna napovedna vrednost = 83 %

CIP-WB G+M: KONGENITALNA TOKSOPLAZMOZA ob poporodnem spremljanju (otrok D0/D20)

Od 54 otrok, predhodno testiranih na D0 (**tabela 1**), je bilo do D20 spremljanih 10 neokuženih in 12 okuženih otrok (n = 22), ki so bili analizirani s testom **TOXOPLASMA WB IgG-IgM**.

- **Na D0:** pri 4 od 12 okuženih otrocih je bil profil isti kot ob rojstvu (lažno negativni rezultati).
- **Na D20:** negativni rezultat se je ohranil samo pri 1 otroku.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POZ	NEG
KLINIČNI PODATKI	POZ CT n = 12	11	1
	NEG CT n = 10	0	10

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

Specifičnost = 100 %

Občutljivost = 92 %

Pozitivna napovedna vrednost = 100 %

Negativna napovedna vrednost = 91 %

CIP-WB IgG: OČESNA TOKSOPLAZMOZA (serum/prekatna vodica)

Spodaj prikazane izvedbe so vzete iz metaanalize štirih študij različnih referenčnih centrov.

Te študije primerjajo izvedbe testa CIP-WB **IgG** z izvedbami izračuna Goldmann-Witmerjevega koeficienta (GWC) in testa PCR. Obenem prikazujejo diagnostične izvedbe, ki združujejo dve ali tri od navedenih tehnik.

V vseh štirih študijah je bil uporabljen test LDBIO v skladu s priporočili v navodilih za uporabo kompleta.

Občutljivost je bila določena na 113 bolnikih s klinično dokazano očesno toksoplazmozo. Specifičnost je bila izračunana na kontrolni populaciji z očesnimi boleznimi, ki niso bile posledice toksoplazmične okužbe: očesna toksokariaza (n = 5), virusna okužba (n = 10), druge okužbe (n = 4), nenalezljive očesne bolezni (n = 126), od katerih siva mrena (n = 42).

Občutljivost (Se)

Splošna občutljivost testa CIP-WB IgG je **62,8 %** (n = 113), izvedba je primerljiva z GWC (Se = 61,0 %, n = 113) in večja od PCR (Se = 43,5 %, n = 92, p = 0,0028).

Kombinacije testa CIP-WB s testoma GWC in PCR poveča občutljivost diagnoze:

CIP-WB + GWC: Se = 78,1 % (n = 96, p = 0,0082)**CIP-WB + GWC + PCR: 86,3 % (n = 95, p = 0,0001)****Specifičnost (Sp)**

Splošna specifičnost testa CIP-WB IgG je **92,8 %** (n = 111), izvedba je primerljiva z GWC (Sp = 94,2 %, n = 139) in manjša od PCR (Sp = 100 %, n = 131, p = 0,0009).

Kombinacija obeh tehnik, CIP-WB IgG + GWC, nekoliko zmanjša specifičnost diagnoze (Sp = 91,1 %, n = 101, p = 0,32). Kombinacija s testom PCR ne vpliva na specifičnost.

Zaključek

Imunološki test **Toxoplasma WB IgG IgM** ima odlične rezultate pri diagnozi prirojene ali očne toksoplazmoze.

Pri prirojeni toksoplazmozi ima CIP-WB G + M občutljivost **76%** [95CI 62-86%] in specifičnost **100%** [95CI 92-100%] ob rojstvu. Ponovno testiranje v prvem mesecu življenja še poveča občutljivost CIP-WB G + M.

Pri očesni toksoplazmozi ima CIP-WB IgG občutljivost **62,8%** [95CI 53,2-71,6%] in specifičnost **92,8%** [95CI 85,9-96,6%]. Kombinacija z drugimi tehnikami (GWC in / ali PCR) poveča diagnostično zmogljivost.

Ponovljivost

Testirana je bila ponovljivost znotraj serij in lotov. V obeh primerih je korelacija serum-serum glede specifičnih črt odlična.

Motnje

Čeprav pri hemoliziranem, zlateničnem ali lipidnem serumu ni bila opažena nikakršna navzkrižna reakcija, pri rezultatih uporabe tovrstnih vzorcev svetujemo skrbno interpretacijo.

ODPRAVLJANJE TEŽAV

»**Trakovi so blede in ne kažejo jasnih kontrastov**«: Tovrstni rezultati so možni pri nekaterih serumih z nizko koncentracijo protiteles.

»**Opaziti je zatemnjena področja, ki so bolj ali manj obarvana in nekoliko razpršena**«: Trak ni bil popolnoma potopljen v enega izmed reagentov, zaradi česar ni bil ustrezno inkubiran po celotni dolžini. Če pladnja po vnosu snovi niste pretresli, se lahko na mestu, kamor je bil vzorec položen, pojavijo tudi madeži.

»**Šum v ozadju je moteč, zaradi česar je odčitavanje izredno zahtevno**«: Pranje ni bilo dovolj izčrpno ali pa je bila zadnja inkubacija predolga. Prepričajte se, da uporabljate ustrezne tehnike izvajanja testa, ter upoštevajte čas pranja in zagotovite vodo visoke kakovosti. Skrajšajte čas inkubacije.

Izjemoma lahko določene vrste seruma reagirajo na nespecifičen način. V tovrstnih primerih rezultati imunoblot testa niso uporabni.

Ta nespecifični šum v ozadju se lahko pojavi samo na enem delu traku, pri čemer rezultatov ni mogoče odčitati le na tistem delu.

»**Med zadnjim delom spreminjanja se v raztopini pojavi oborina**«: ob koncu spreminjanja se lahko substrat v pufri dejansko delno obori (nastanejo črne luske). Ta pojav ne vpliva na kakovost spreminjanja, s katerim lahko nadaljujete normalno. Zadnje pranje z destilirano vodo odstrani morebitno prisotne trdne delce.

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).

Obvestilo o posodobitvi - Pozorno preberite

DATUM IZDAJE	RAZLIČICA	POVZETEK SPREMEMB
26/07/2021	Vs 18	Odstranitev varnostnega opozorila R5 - Kontaktni e-poštni naslov – NaN3 EUH 032.
29/07/2022	Vs 19	R6 brez NaN3. Trakovi označeni s črko A. Možnost uporabe reagentov iz različnih serij
30/11/2022	Vs20	Novi naslov



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