

LDBIO TOXO II IgM CE0459



CONFIRMACIÓN

Test de diagnóstico *in vitro* por inmunoblot
Técnica semiautomática / manual

#T2M-24M: 24 pruebas

#T2M-12M: 12 pruebas

#T2M-96M: 96 pruebas

INSTRUCCIONES DE USO

Encuentre más información e instrucciones de uso en su idioma en nuestra página web
www.ldbiodiagnostics.com

USO PREVISTO

LDBIO TOXO II IgM es un test de diagnóstico serológico cualitativo de IgM mediante una prueba de inmunoblot de toxoplasmosis previsto como prueba confirmatoria de resultados positivos por técnicas diagnósticas clásicas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Técnica Western Blot

Los antígenos de *Toxoplasma gondii*, una vez separados mediante electroforesis, se unen mediante electrotransferencia a la superficie de una membrana de nitrocelulosa (llamada de transferencia), que se corta en 24 tiras numeradas del 1 al 24.

Desarrollo de la prueba

Cada muestra de suero a ensayar se incuba por separado con una tira. Los anticuerpos, potencialmente presentes en la muestra, se unen de forma selectiva a los antígenos. La anti-IgM humana conjugada con fosfatasa alcalina se une posteriormente a los anticuerpos unidos. Finalmente, los inmunocomplejos reaccionan al sustrato. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos de tipo IgG presentes en las muestras aparecen como bandas transversales de color púrpura.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

Por defecto: Caja con 24 pruebas (#T2M-24M)

*cursiva: caja con 12 pruebas (#T2M-12M) - **negrita: Caja con 96 pruebas (#T2M-96M).***

| ID | Cantidad | Descripción | Composición |
|-----|----------|--|---|
| R1 | 1 | Carpeta(s) con 24 (12, 4x24) TIRAS: precortadas + estándares de color. (Cada carpeta y cada tira se identifica mediante un número de serie único) | Nitrocelulosa sensibilizada. Peso molecular codificado por colores (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15. |
| R2 | 1 | Frasco de 30 (30,125) mL de DILUYENTE DE MUESTRAS (Listo para su uso - solución rosada). | Tampón + tensioactivo + NaN3 (<0,1%). |
| R4 | 1 | Frasco(s) de 30 (30,2x60)mL de CONJUGADO ANTI IgM (Listo para su uso - solución azul). | Tampón + sueros policlonales de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizadores. |
| R5 | 1 | Frasco de 30 (30,125)mL de SUSTRATO (Listo para su uso - frasco marrón opaco). | Tampón + nitroazul de tetrazolio (NBT) + 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) + estabilizadores. |
| R6 | 1 | Frasco de 60 (60, 250)mL de TAMPÓN DE LAVADO CONCENTRADO 10X (<u>Para diluir 10 veces</u> en agua destilada - solución incolora). | Tampón + tensioactivo. |
| R10 | 1 | Vial de 100 (100, 2x100) µl de SUERO de CONTROL POSITIVO (Listo para su uso - tapón rojo). | Tampón + mezcla de suero humano positivo en serología para <i>Toxoplasma</i> + NaN3 (<0,1%) + estabilizadores. |

R1: . La letra antes del número de cada tira es específica del parámetro

R2, R4, R5 y R6 son los mismos para todos los kits y tienen un número de lote único dependiendo solo de su fecha de producción. **Se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunoblot de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.**

El **R10** está calibrado en inmunoblot de acuerdo con un lote de referencia y solo está dedicado a esta técnica.

R4, R10 (NaN3): EUH 032 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

EUH 210 Puede solicitar la ficha de datos de seguridad, o consultarla en nuestra página web www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL NECESARIO Y NO SUMINISTRADO

- Bandejas de incubación de polipropileno multicanal para mini-blot (#WBPP-08 o equivalente).
- Agitador ascilante para inmunoblot sistema de vacío para líquidos (los tubos #WBPP-08 que suministramos pueden vaciarse con un simple giro).
- Tubos y material para la extracción de muestras, provetas graduadas.
- Pipetas automáticas, micropipetas y puntas desechables (volúmenes de 10 µl, 1,2 ml y 2 ml).
- Agua destilada o desionizada. Papel absorbente (p. ej., papel de filtro Whatman), cinta adhesiva transparente.
- Guantes, pinzas para manipular las tiras, cuchilla o bisturí y regla plana transparente.

Nota: nuestros reactivos pueden utilizarse en un procesador automático de Inmunoblot. **Se debe prestar atención a los contaminantes químicos de nuestros reactivos en caso de que el procesador sea compartido con reactivos de otro fabricante** (un ejemplo conocido: contaminación por el TWEEN 20), y contaminaciones bacterianas. Frascos de reserva para el procesador. Después del procesamiento, no vuelva a colocar los reactivos usados restantes en los frascos originales.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacenar a una temperatura entre 2 y 8°C. Los reactivos del Kit permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja exterior y las etiquetas de los frascos. No use reactivo contaminado o turbio. El tampón de lavado diluido al 1/10 permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre +2 y +8 C y una semana a temperatura ambiente.

PRECAUCIONES DE USO

Seguridad

- Solo para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional. Solo para personal capacitado técnicamente. Manipule conforme a la buena práctica de laboratorio y considere cualquier reactivo y cualquier muestra como potencialmente tóxicos y/o infecciosos.
- Haga uso de una bata de laboratorio, guantes y gafas; no beba, coma ni fume en el laboratorio. No introduzca las pipetas en la boca.
- El control positivo es un suero de origen humano que ha sido inactivado para los virus VIH 1 y 2, hepatitis B y hepatitis C. No obstante, debe manipularse como si fuera un producto potencialmente infeccioso.
- El sustrato contiene una mezcla de NBT y BCIP, tóxica al contacto (con la piel y las membranas mucosas) y por inhalación.
- Los reactivos contienen azida sódica, que puede formar sales metálicas explosivas con el plomo y el cobre. Enjuague las salpicaduras con agua.
- Elimine los residuos (muestras, puntas, tubos, líquido de lavado, reactivo usado...) de acuerdo con las buenas prácticas empleadas en la industria y la normativa vigente del país.
- Cualquier incidente grave debe ser objeto de una declaración al fabricante y a la autoridad competente.

Precauciones

- Lea e interprete los resultados bajo luz blanca directa.
- Es preferible utilizar todos los reactivos del mismo lote. Si se utilizan diferentes lotes, garantizar la trazabilidad
- Utilice las tiras en orden numérico. No mezcle las tiras procedentes de cajas con números de serie diferentes; utilice las tiras consecutivamente. Establezca un plan de distribución específico antes de comenzar la prueba.
- No toque las tiras con los dedos; utilice pinzas.
- Los reactivos deben mezclarse bien antes de su uso, especialmente el tampón de lavado concentrado.
- Cierre los frascos después de cada uso; no se deben utilizar si se introdujera accidentalmente una sustancia en los reactivos. No utilice el reactivo de un frasco que presente indicios de fuga. No utilice soluciones turbias o precipitadas.
- Utilice solo puntas de pipetas desechables. Evite cualquier contaminación entre los canales. Vigile la formación de espuma o burbujas en las puntas de las pipetas (contaminación bacteriana de los frascos de reactivos).
- Limpie las bandejas de incubación solo con agua limpia y seguidamente con agua destilada (no utilice nunca detergente ni lejía).
- La omisión de una muestra o la distribución de un volumen inadecuado pueden dar lugar a un resultado negativo o positivo de la prueba, independientemente de su situación real.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Recoja las muestras en tubos secos de forma aséptica. Se requiere una cantidad mínima de suero de 10 µl.

Mantenga las muestras a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento durante más de una semana. Congele las muestras a una temperatura de -20 ± 5 °C si precisan almacenamiento. No utilice la muestra que esté contaminada. Evite la congelación y descongelación repetidamente de las muestras.

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictericos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados de dichas muestras con cautela.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tampón de lavado: para 4 pruebas, en un frasco limpio, diluya 10 ml de concentrado de lavado 10X (R6) en 90 ml de agua destilada o desionizada.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Nota Bene: se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunoblots de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.

1. Prepare un plan de distribución para las muestras y un control positivo C+ (**R10**).

Solo mediante el uso de este control será posible validar la prueba técnicamente y llevar a cabo la identificación, para un número de serie determinado de las bandas específicas desarrolladas. No puede utilizarse una tira C+ para interpretar los resultados de los inmunoblots con un número de serie diferente.

2. Corte el número de tiras necesario (R1) con un bisturí y una regla plana transparente limpia, manteniendo la línea azul de posición en las tiras: sujete las tiras con firmeza de acuerdo con la posición de la regla y córtelas por el lado donde se está haciendo presión (los números son visibles a través de la regla).
3. Distribuya 1,2 mL de diluyente de muestras (R2) en cada canal de acuerdo con el plan establecido.
4. Deposite, por orden numérico, las tiras numeradas en los canales: deje que las tiras se rehidraten en la superficie del diluyente durante aproximadamente 2 minutos, con el número visible en la parte superior, LUEGO agitando suavemente la bandeja para sumergirlas completamente en el diluyente.
5. Distribuya las muestras y los controles positivos: de acuerdo con el plan de distribución, a razón de 10 µl por canal. Agite suavemente la bandeja después de cada dispensación. Coloque la bandeja en un agitador oscilante.
Incube durante 90 minutos ± 5 minutos a temperatura entre 20 y 26 °C.
6. Fase de lavado: vacíe el contenido de los canales con una pipeta Pasteur o girando la bandeja de incubación. Distribuya entre 2 y 3 mL de tampón de lavado diluido en cada canal. Incube en el agitador oscilante durante 3 minutos. Repita 2 veces la operación, después vacíe el contenido de los canales. Asegúrese de que las tiras no se giran durante estas fases.
7. Distribuya 1,2 mL de conjugado anti-IgM (R4) en cada canal. Coloque la bandeja en el agitador oscilante.
Incube durante 60 minutos ± 5 minutos a una temperatura entre 20 y 26 °C.
8. Fase de lavado: repita el paso 6.
9. Distribuya 1,2 mL de sustrato NBT/BCIP (R5) en cada uno de los canales. Coloque en el agitador oscilante y proteja de la luz directa. **Incube durante 60 minutos** ± 5 minutos a una temperatura entre 20 y 26 °C.

Independientemente de cuál sea el parámetro, supervise la variación del color. La variación se puede interrumpir si se oscurece el color de fondo de la tira hasta llegar a un punto en que la lectura sea difícil (la calidad de las fases de lavado influye directamente en la coloración de fondo). Es preciso tener en cuenta que las tiras tienden a aclararse a medida que se secan.

10. Interrumpa la reacción mediante la aspiración de sustrato con una pipeta Pasteur o girando el cubo de incubación y distribuyendo 2 mL de agua destilada en los canales. Repita una vez más esta última fase de lavado.
11. Secado de las tiras: con los canales todavía llenos de agua, sujete las tiras por el extremo numerado con las pinzas y deposítelas en el papel absorbente Whatman con el número visible. Deje secar al aire. El color de las tiras se aclarará de forma natural al secarse. La interpretación de la prueba solo debe realizarse una vez finalizado el secado.
12. Almacenamiento: transfiera las tiras a una hoja de papel, que se utilizará para archivarlas. Alinee las líneas de posición. Manténgalas de acuerdo con la posición de la regla plana, pegue la parte superior de las tiras con cinta adhesiva transparente.

Para una interpretación acertada, las tiras deben ordenarse por transferencia y por orden numérico y debe haber un espacio de separación máximo entre ellas de varios milímetros. No es fiable comparar las tiras que están muy separadas (p. ej., la n.º 2 con la n.º 15). **Es arriesgado** (resultados falsos) comparar las tiras de kits diferentes (tiras con números de serie diferentes).

CONTROL DE CALIDAD E INTERPRETACIÓN

El suero de control (R10) suministrado con el kit debe incluirse sistemáticamente en las series de inmunoblot. Muestra el perfil típico y permite (1) la validación técnica del desarrollo satisfactorio de la prueba (las bandas deben ser claramente visibles en la tira) y (2) calibrar con precisión la posición y el aspecto de las bandas específicas para permitir la interpretación de los resultados de las tiras de la misma transferencia (con el mismo número de serie).

Nota Bene: El perfil del control positivo (R10) puede variar según el número de lote de los reactivos utilizados y puede, en particular, no presentar todas las bandas intermedias (P31, 33, 38), más raramente presentes en muestras positivas. Las imágenes correspondientes están disponibles en nuestro sitio web www.ldbiodiagnostics.com como ejemplo.

Descripción de las bandas

Una muestra positiva puede presentar numerosas bandas situadas entre 15 y 200k kilodaltons (kDa). Busque la presencia de bandas específicas en el área de 30-40 kDa para cada una de las muestras analizadas con las herramientas de calibración descritas anteriormente. Estas bandas, agrupadas y bien aisladas, son típicas y generalmente se pueden encontrar con mucha facilidad.

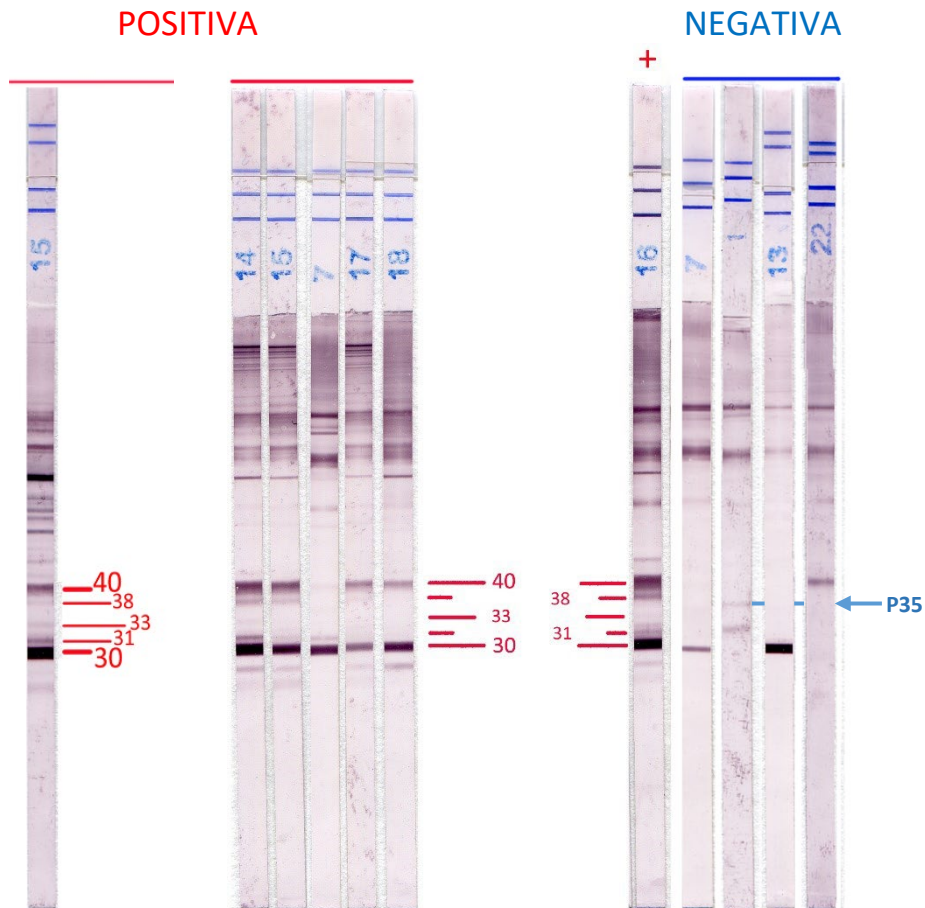


Fig. 1: Ejemplos de resultados positivos y negativos (Peso molecular: kDa)

Los perfiles se dan como ejemplos. Las tiras están marcadas con la letra "K" específica del parámetro del lote "50016".

Interpretación

La presencia en la tira de **un mínimo de 2 bandas de las bandas específicas P30, P31, P33, P38 y P40, Y la inclusión de la banda P30 kDa**, permite interpretar el ensayo como positivo y concluir que anti-T. los anticuerpos gondii IgM están presentes en la muestra analizada

Nota Bene:

- **P30 y P40** son las bandas más frecuentes en caso de serología IgM positiva leve.
- Se pueden observar otras bandas (por ejemplo, **P35**). No se tienen en cuenta al leer la prueba.

Para validar los resultados, compare siempre el perfil del inmunoblot de cada muestra con el del control positivo R10. El aspecto de las bandas es importante a la hora de interpretar la prueba.

LIMITACIONES DE USO

- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se puede establecer sobre la base de un solo resultado analítico.
- Estos resultados serológicos deben interpretarse de acuerdo con la información disponible (por ejemplo epidemiológica, clínica, imágenes, biológica, etc.) para poder establecer un diagnóstico. No deben utilizarse como base para el diagnóstico basándose únicamente en su positividad.

PRESTACIONES (ver referencias bibliográficas)

La evaluación se realizó a través de un estudio multicéntrico que involucró a cuatro laboratorios de referencia, especializados en el diagnóstico de toxoplasmosis.

La evaluación incluyó dos cohortes de mujeres embarazadas con resultado positivo en la prueba de IgM: una fue de seguimiento de seroconversiones comprobadas por la aparición de IgG (93 seroconversiones / 229 muestras), la otra de mujeres que tuvieron falso positivo de IgM por al menos una técnica de screening y cuya inespecificidad se comprobó luego mediante un seguimiento iterativo de las muestras sin seroconversión IgG (68 pacientes / 158 muestras)

Cada centro utilizó su propio panel de técnicas de IgM que permitía comparar el rendimiento de la WB con 6 kits disponibles en el mercado.

1. Estudio del rendimiento de la WB en la confirmación de la seroconversión:

Sensibilidad: WB Toxo II IgM fue positivo para 91 de las 93 seroconversiones, lo que confirma la infección por Toxoplasma.

$$Se = 97,8\% (IC95 [91,7-99,6\%])$$

Especificidad: WB Toxo II IgM fue negativo para 61 de los 68 pacientes con IgM falsa que confirma la ausencia de infección por Toxoplasma.

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

2. Estudio comparativo del rendimiento del WB Toxo II IgM, muestra por muestra:

Todos los resultados de WB (n=387) se compararon con los obtenidos por las otras 6 técnicas utilizadas en el estudio en los 4 laboratorios de referencia: IgM ELISA o autómatas e ISAGA IgM.

Los resultados detallados de este estudio han sido publicados: "*Diagnostic Accuracy of LDBIO-Toxo II IgG and IgM Western Blot in Suspected Seroconversion in Pregnancy: A Multicentre Study*". *Pathogens* **2022**, *11*(6), 665. doi: 10.3390/pathogens11060665 / Supplementary material File 1.

El WB muestra una sensibilidad equivalente y una especificidad superior a todas las demás técnicas utilizadas.

Las excelentes prestaciones del kit LDBIO TOXO II IgM justifican su uso como confirmación de los resultados obtenidos mediante técnicas de cribado de IgM (resultados equívocos, resultados positivos débiles o resultados con dificultades de interpretación).

Reproducibilidad

Se analizó la reproducibilidad entre series y entre lotes. En ambos casos, la correlación entre los sueros con respecto a las bandas específicas es excelente.

Interferencia

Aunque no se ha observado ninguna reacción cruzada con sueros hemolizados, ictéricos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados de dichas muestras con cautela.

SOLUCION DE PROBLEMAS

"Las bandas son pálidas con poco contraste": Algunos sueros con concentraciones bajas de anticuerpos pueden aportar esos resultados.

"Pueden apreciarse áreas sombreadas, más o menos coloreadas y ligeramente difusas": La banda no se sumergió totalmente en uno de los reactivos y no incubó correctamente en toda su longitud. Puede asimismo haber presencia de manchas donde se depositó la muestra si no se sacudió la bandeja después de la dispensación.

"El ruido de fondo es considerable, lo que dificulta la lectura": Los lavados fueron insuficientes o la última incubación fue demasiado larga. Asegure unas buenas técnicas de ejecución de las pruebas, respete los tiempos de lavado y la calidad del agua. Reduzca el tiempo de la última incubación.

Excepcionalmente, algunos sueros pueden reaccionar de manera no específica. Entonces, no es posible utilizar el resultado del inmunoblot.

Este ruido de fondo no específico puede comprometer solo parte de la tira, arrojando resultados no interpretables para esa parte únicamente.

"Aparece un precipitado en la solución durante la última fase de desarrollo": Puede haberse precipitado el sustrato (escamas negras) en el tampón al final del desarrollo. Este fenómeno no altera la calidad del desarrollo, el cual debe continuarse normalmente. El último lavado con agua destilada elimina las posibles partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFÍA

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.

ACTUALIZACIONES – Lea atentamente

| Fecha de Lanzamiento | VERSIÓN | RESUMEN DE LA MODIFICACIÓN |
|----------------------|---------|---|
| 29/06/2022 | Vs 02 | Prestaciones: referencia a publicaciones en lugar de tabla – actualización kits de referencia |
| 30/11/2022 | Vs03 | Nueva dirección |
| 02/01/2023 | Vs04 | R6 sin NaN3. Tira identificada con letra. Posibilidad de usar reactivos de diferentes lotes. |
| 06/02/2023 | Vs05 | Indicación de la banda P35 (no específica) |
| 20/09/2023 | Vs06 | Nombre y referencias de color azul |



NF EN ISO 13485

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