

TOXOPLASMA CE0459



Western Blot IgG IgM

Prueba de inmunotransferencia de diagnóstico *in vitro*
Técnica semiautomática / manual

#TOP-WB24GM: 24 pruebas

#TOP-WB12GM: 12 pruebas

#TOP-WB96GM: 96 pruebas

INSTRUCCIONES DE USO

Encuentre más información e instrucciones d'uso en su idioma en nuestro sitio web

www.ldbiodiagnostics.com

USO PREVISTO

TOXOPLASMA WB IgG-IgM es una prueba de inmunotransferencia de un solo uso para la Comparación de Perfiles Inmunológicos (CIP-WB) IgG e IgM destinada al diagnóstico de:

- La toxoplasmosis congénita en el nacimiento (D0): CIP-WB G+M entre la sangre materna y la sangre del cordón.
- La toxoplasmosis congénita en seguimiento postnatal (D+N): CIP-WB G+M entre la sangre del cordón en D0 y la sangre del recién nacido en D+N.
- La toxoplasmosis ocular: CIP-WB IgG entre el suero del paciente y el humor acuoso.

Esta prueba no está destinada a la detección o confirmación de serologías aisladas. Para estos fines, se debe utilizar la prueba **LDBIO TOXO II IgG** (ref. TOXO II IgG WB).

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Técnica Western Blot

Los antígenos *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

Nota: Las pruebas de inmunotransferencia IgG o IgM que se describen a continuación se realizan de forma simultánea durante la manipulación.

Inmunotransferencia IgG

La prueba consiste en incubar por separado, **con dos tiras contiguas procedentes de la misma transferencia**, los dos sueros cuyos perfiles Inmunológicos se desea comparar.

- Fase 1: Cada muestra de suero (o humor acuoso) del ensayo se incuba por separado con una tira. Los anticuerpos específicos, potencialmente presentes en la muestra, se unen de forma selectiva a los antígenos.
- Fase 2: El conjugado de fosfatasa alcalina con **anti-IgG humana** se une posteriormente a los anticuerpos unidos.
- Fase 3: Finalmente, los inmunocomplejos reaccionan al sustrato. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos **de clase IgG** presentes en las muestras aparecen como bandas transversales de color púrpura.

Inmunotransferencia IgM

La prueba sigue un principio idéntico, al reemplazar en la fase 2 el conjugado anterior por un conjugado de fosfatasa alcalina – **anti-IgM humana**. Por consiguiente, la revelación evidenciará las bandas antigénicas reconocidas por los anticuerpos específicos de **clase IgM** presentes en las muestras.

Lectura

La comparación sucesiva de las parejas de tiras IgG y luego IgM permite detectar la presencia eventual de bandas que solo se revelan mediante uno de los muestras y no el otro (cf. § Interpretación).

Reactivos suministrados

Por defecto: Caja con 24 pruebas (#TOP-WB24GM)

cursiva: Caja con 12 pruebas (#TOP-WB12GM) - **negrita:** Caja con 96 pruebas (#TOP-WB96GM).

ID	Cantidad	Descripción	Composición
R1	1	Carpeta(s) con 24 (12, 4x24) TIRAS: precortadas + estándares de color. (Cada carpeta y cada transferencia 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 AMORTIGUADOR DE MUESTRAS (Listo para su uso - solución rosada).	Amortiguador + tensioactivo.
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 60) mL de CONJUGADO ANTI IgG (Listo para su uso - solución azul).	Amortiguador + sueros policlonales de cabra anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizadores.
R4	1	Frasco(s) de 30 (30, 60) mL de CONJUGADO ANTI-IgM (Listo para su uso - solución amarillo).	Amortiguador + suero policlonal de cabra anti-IgM humana conjugado con fosfatasa alcalina + NaN3 (inf. 0,1 %) + estabilizadores.
R5	1	Frasco de 30 (30, 125) mL de SUSTRATO (Listo para su uso - frasco marrón opaco).	Amortiguador + nitroazul de tetrazolio (NBT) + 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) + estabilizadores.
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) mL de AMORTIGUADOR DE LAVADO CONCENTRADO 10X (<u>Para diluir 10 veces</u> en agua destilada - solución incolora).	Amortiguador + tensioactivo.

R1: La letra que precede a cada número de banda es específica del parámetro.

R2, R3, 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 inmunotransferencia de LDBIO), para limitar el número de frascos abiertos y asegurar un mejor control de calidad.**

R3, R6, R10 (NaN3): EUH 032 - En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

EUH 210 Puede solicitarse la ficha de datos de seguridad, así como en nuestro sitio web

www.ldbiodiagnostics.com

SE REQUIERE MATERIAL ADICIONAL NO SUMINISTRADO

- Bandejas de incubación de polipropileno multicanal para mini transferencias (#WBPP-08 o equivalente).
- Plataforma giratoria para inmunotransferencias, 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, cilindros graduados. Pipetas automáticas, micropipetas y puntas desechables (volúmenes de 10 µl, 25µl, 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 inmunotransferencia. **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 amortiguador 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 tenga en cuenta 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 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 lotes diferentes, hay que garantizar la trazabilidad.
- Utilice las tiras en orden numérico. No mezcle las tiras procedentes de cajas con números de serie diferentes; utilice las transferencias 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 amortiguador 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).
- Limpié 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 ESPECIMENES

Recoja las muestras en tubos secos de forma aséptica. Se requiere una cantidad mínima de suero de 35 µL, o de humor acuoso de 10µL. En los casos de humor acuoso, el uso de 25 µL aumentará la sensibilidad de la prueba (Consulte el § Procedimiento de la prueba).

Mantenga las muestras a una temperatura entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento. Congele las muestras a una temperatura de -20 ± 5 °C si precisan almacenamiento durante más de una semana. 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, ictéricos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados a partir del uso cauteloso de dichas muestras

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Amortiguador 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. Tenga cuidado de mezclar bien el tampón diluido.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Nota Bene: se recomienda realizar series multiparamétricas (véase el rango de inmunotransferencia 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.

Es estrictamente obligatorio realizar la comparación de una pareja de muestras con la ayuda de tiras conjuntas (números contiguos) procedentes de una misma transferencia (mismo número de serie). 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).

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 amortiguador 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 amortiguador durante aproximadamente 2 minutos, con el número visible en la parte superior, LUEGO agitando suavemente la bandeja para sumergirlas completamente en el amortiguador.
5. Distribuya las muestras de acuerdo con el plan de distribución establecido (fase 1) y los volúmenes siguientes:

	Serum	Humor Acuoso
IgG	10µL	10 o 25µL
IgM	25µL	-

En los casos de humor acuoso, el uso de 25 µl aumentará la sensibilidad de la prueba.

Agite suavemente la cubeta después de cada dispensación. Coloque la bandeja en una plataforma giratoria.

Incube durante 90 min ± 5 min 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 amortiguador de lavado diluido en cada canal. Incube en la plataforma giratoria durante 3 min. 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 de acuerdo con el plan de distribución establecido 1,2 ml de conjugado anti-IgG (R3) o 1,2 mL de conjugado anti-IgM (R4) en cada uno de los canales correspondientes. Coloque la bandeja en la plataforma giratoria.

Incube durante 60 min ± 5 min 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 la plataforma giratoria y proteja de la luz directa.

Incube durante 60 min ± 5 min 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.

- Es esencial interrumpir simultáneamente la revelación de las dos tiras de una misma pareja para un mismo subtipo de anticuerpos, pero se puede interrumpir por separado la revelación de las IgG o IgM (las IgM, de concentración más débil, suelen revelarse más lentamente que las IgG).
- El suero de un niño suele contener menos IgM. Hay que dejar el tiempo necesario para que la reacción se revele correctamente y no preocuparse si la tira IgM materna se ensombrece algo más
- El humor acuoso suele contener menos anticuerpos. Hay que dejar el tiempo necesario para que la reacción se revele correctamente y no preocuparse si las tiras séricas se ensombrecen algo más.

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. Ajuste con precisión las tiras con la ayuda de la marca de posición. Manténgalas dos a dos con la regla plana y pegue la parte superior de las tiras con cinta adhesiva transparente.

Coloque unas junto a otras las tiras IgG e IgM de cada pareja de muestras siguiendo los números ascendentes, de acuerdo con el plan de distribución establecido (fase 1).

Es estrictamente obligatorio realizar la comparación de una pareja de muestras con la ayuda de tiras conjuntas (números contiguos) procedentes de una misma transferencia (mismo número de serie). 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

Descripción de las bandas

Una muestra positiva puede presentar numerosas bandas con un peso molecular de entre 15 y 200 kDa. Para comparar los perfiles solo se pueden utilizar las bandas cuyo peso molecular sea inferior a 120 kDa.

Interpretación

CIP-WB G+M (Toxoplasmosis congénita)

- En el nacimiento (parejas madre/hijo):

Compare por separado las tiras IgG y las tiras IgM. Lea simultáneamente las dos tiras contiguas de arriba abajo y tome nota de cualquier banda antigénica **presente** en la sangre del cordón **y ausente** en el suero materno.

Cualquier banda de resolución bien definida, de un peso molecular (PM) inferior a 120 kDa y *presente solamente en el niño*, indica que este ha sintetizado anticuerpos antitoxoplasma, en beneficio de una toxoplasmosis congénita.

- Durante el seguimiento postnatal (parejas niño D0/niño D+N):

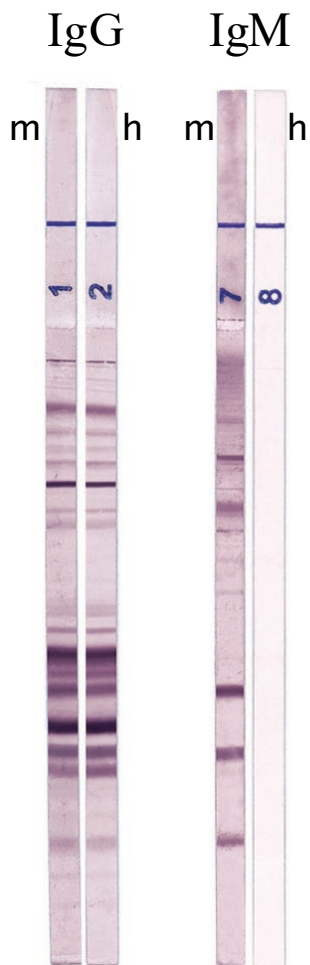
Compare por separado las tiras IgG y las tiras IgM. Lea simultáneamente las dos tiras contiguas de arriba abajo y tome nota de cualquier banda antigénica **presente** en el suero en D+N **y ausente** en la sangre del cordón

Cualquier banda de resolución bien definida, de un PM < 120 kDa y *presente solamente en D+N*, indica que el niño ha sintetizado anticuerpos antitoxoplasma, en beneficio de una toxoplasmosis congénita.

Nota bene: la indicación del CIP-WB IgG/IgM en el seguimiento postnatal se limita de forma voluntaria a tres meses en IgG y a un mes en IgM.

Notas: La yuxtaposición del estándar de pesos moleculares teñido (funda R1) permite calcular el PM de las bandas antigénicas reveladas (antes hay que recortarlo con la ayuda de una regla y un bisturí en forma de tira ordinaria y manipularlo con pinzas).

A - CIP NEGATIVO
(niño no contaminado)



B - CIP POSITIVO
(niño contaminado)

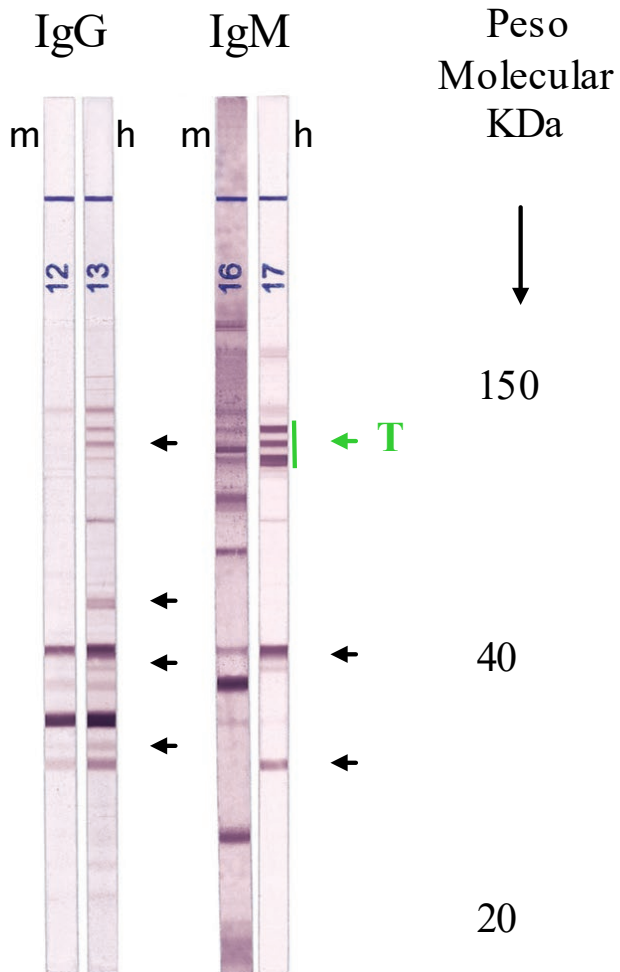


Fig. 1: *Toxoplasmosis congénita* - ejemplos de resultados positivos y negativos – (m= madre; h= hijo)

Los perfiles se dan como ejemplos. Las tiras están marcadas con la letra "A" específica del parámetro del lote "00011".

La pareja madre-hijo (A) corresponde a una madre contaminada durante el embarazo pero cuyo hijo está sano: Los perfiles IgG son estrictamente idénticos (IgG transmitidas); no aparece ninguna banda adicional en las tiras IgG y/o IgM del niño: **EL CIP-WB ES NEGATIVO.**

La pareja (B), **toxoplasmosis congénita**, corresponde a una madre contaminada durante el embarazo y cuyo hijo también ha sido contaminado. Además de la transmisión de los anticuerpos, en las tiras del niño se observa perfectamente la presencia de bandas adicionales (←), en IgG y/o en IgM, correspondientes a los anticuerpos neosintetizados por el niño: **EL CIP-WB ES POSITIVO.**

CIP-WB IgG (Toxoplasmosis ocular)

Lea simultáneamente las dos tiras contiguas de arriba abajo y tome nota de cualquier banda antigénica **presente** en el humor acuoso **y ausente** en el suero.

Cualquier banda de resolución bien definida, de un peso molecular (PM) inferior a 120 kDa y *presente solamente en el humor acuoso*, indica la sintetización local de anticuerpos antitoxoplasma, en beneficio de una toxoplasmosis ocular.

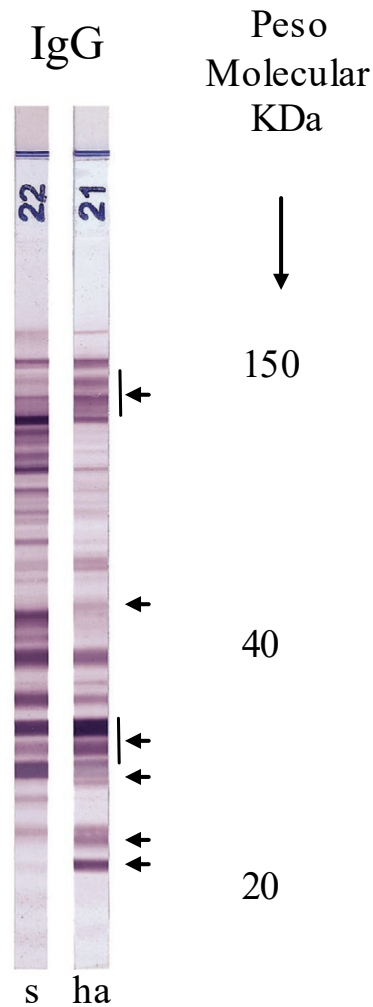


Fig. 2: Toxoplasmosis ocular - ejemplo de resultado positivo – (s= suero; ha= humor acuoso)

Los perfiles se dan como ejemplos. **Las tiras están marcadas con la letra "A" específica del parámetro del lote "00011".**

Notas muy importantes

1. Los resultados del CIP-WB IgG/IgM se deben interpretar teniendo en cuenta el resto de los datos clínicos, serológicos, parasitológicos, epidemiológicos e imágenes médicas con el fin de establecer el diagnóstico de toxoplasmosis congénita u ocular.
2. Un resultado CIP-WB IgG/IgM negativo no excluye el diagnóstico de toxoplasmosis congénita u ocular. Es necesario realizar un seguimiento de estos pacientes hasta que se pueda confirmar o descartar de forma definitiva el diagnóstico de toxoplasmosis.

3. Las bandas pueden adoptar aspectos muy variables: finas, gruesas, más o menos coloreadas, intensas...
Durante el proceso de control de esta técnica, se recomienda realizar algunas comparaciones de perfiles a partir de parejas de muestras conocidas para familiarizarse con la lectura. Se recomienda asimismo que, al principio, efectúen la lectura de los CIP-WB dos personas distintas del laboratorio. En caso de interpretaciones discordantes, se debe realizar un CIP-WB de control.
4. Las fracciones antigénicas de peso molecular (PM) muy elevado se muestran muy apretadas en la parte superior de la tira en beneficio de una mejor resolución de las fracciones de PM medio y bajo. Por lo tanto, las bandas de un PM > 120 kDa no se pueden utilizar en la interpretación de la prueba: las muestras que presentan únicamente estas diferencias de perfiles no pueden ser positivas.
5. En cambio (toxoplasmosis congénita), en los CIP WB IgM positivos suele observarse con frecuencia un "trío" (tres bandas muy fácilmente distinguibles) situado entre 75 y 100 kDa (véase "T" la **fig. 1** tira n.º 17, lado derecho).
6. En el nacimiento (toxoplasmosis congénita), hay que desconfiar especialmente de cualquier intensificación generalizada de las bandas (hemoconcentración) que podría hacer pensar en bandas adicionales en la sangre del cordón. Los sueros que presentan únicamente estas diferencias de perfiles son negativos.
7. En cambio (toxoplasmosis congénita, toxoplasmosis ocular), el refuerzo significativo (a menudo en términos de anchura e intensidad) de una o dos bandas aisladas, mientras el resto de bandas presentan una intensidad idéntica o más débil, se considera un criterio de positividad.
8. Anticuerpos naturales (toxoplasmosis congénita):
La técnica de inmunotransferencia es extremadamente sensible y se ha seleccionado el antígeno utilizado para la prueba CIP WB debido a la multiplicidad de bandas antigénicas presentes en la tira. En numerosas publicaciones se habla de las bandas reveladas por inmunotransferencia en personas que no han contraído nunca la toxoplasmosis. Estos anticuerpos (IgG e IgM) solo son raramente detectados por las otras técnicas pero sí que se detectan con mucha frecuencia mediante inmunotransferencia. Se podrían deber a reacciones cruzadas con anticuerpos destinados contra inmunógenos de naturaleza todavía por determinar.
Por este motivo la prueba **TOXOPLASMA WB IgG-IgM** solo está indicada para la comparación de perfiles. (Para la confirmación de serologías IgG, utilice la prueba **LDBIO TOXO II IgG**, específica y destinada a este fin)
Los recién nacidos no presentan anticuerpos naturales (salvo los anticuerpos maternos transmitidos), pero la probabilidad de aparición de anticuerpos naturales aumenta con la edad del lactante a partir de los tres meses; con muy poca frecuencia se observan entre los tres y seis meses.
Por este motivo la indicación del CIP-WB IgG/IgM en el seguimiento postnatal se limita de forma voluntaria a tres meses en IgG y a un mes en IgM: efectivamente, la aparición de bandas no específicas se observa en una fase más temprana en IgM.
9. "Heat Shock Protein" (toxoplasmosis congénita):
Puede aparecer una banda fina no específica, de intensidad débil pero variable, en IgM a la altura de los 37 kDa. Se trata de un artefacto vinculado a la preparación del antígeno y denominado "Heat Shock Protein". En ocasiones está presente en las dos tiras de la pareja madre-hijo, pero también puede aparecer más pronunciada con determinados sueros durante el seguimiento del niño. No tenga en cuenta esta banda.
10. CIP-WB (toxoplasmosis ocular): El CIP-WB IgM no tiene ninguna utilidad en el diagnóstico de la toxoplasmosis ocular. Al contrario, el CIP-IgA es de interés diagnóstico. Para más información sobre el CIP-IgA, por favor contáctenos.

LIMITACIÓN DE USO

- El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no puede establecerse basándose en el resultado de una sola prueba.
- Los resultados serológicos deben ser interpretados de acuerdo con la información disponible (por ejemplo, epidemiología, clínica, imágenes, biología...) para establecer un diagnóstico. No deben utilizarse como base para el diagnóstico basándose únicamente en su positividad.

PERFORMANCE (ver referencias bibliográficas P. 12)

Estos estudios han sido llevados a cabo por laboratorios independientes de referencia.

CIP-WB G+M: Toxoplasmosis congénita en el nacimiento (madre/hijos)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DATOS	POS TC n = 54	41	13
CLÍNICOS	NEG TC n = 60	0	60

Tabla 1: Resultados del CIP-WB IgG/IgM en el nacimiento (n = 114)

Especificidad = 100%

Valor Predictivo Positivo = 100%

Sensibilidad = 76%

Valor Predictivo Negativo = 83%

CIP-WB G+M: Toxoplasmosis congénita en seguimiento postnatal (niño D0/D20)

Entre los 54 niños analizados con anterioridad en D0 (**tabla 1**), se ha realizado un seguimiento en D20 de 10 niños sanos y 12 niños contaminados (n=22), y se han analizado retrospectivamente con la prueba TOXOPLASMA WB IgG-IgM.

- **En D0:** 4 niños de los 12 niños contaminados no presentaron ningún perfil distinto en el nacimiento (falsos negativos).
- **En D20:** solo 1 sigue siendo negativo.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DATOS	POS TC n = 12	11	1
CLÍNICOS	NEG TC n = 10	0	10

Tabla 2: Resultados del CIP-WB IgG/IgM en D20 (n = 22)

Especificidad = 100%

Valor Predictivo Positivo = 100%

Sensibilidad = 92%

Valor Predictivo Negativo = 91%

CIP-WB IgG: Toxoplasmosis ocular (suero/humor acuoso)

Los rendimientos indicados a continuación proceden del metanálisis de cuatro estudios publicados por centros de referencia.

Estos estudios comparan los rendimientos de CIP-WB IgG con los del coeficiente de Goldmann Witmer (GWC) y los de la PCR. También muestran los rendimientos diagnósticos obtenidos de la asociación combinada de dos o tres de estas técnicas.

Los cuatro estudios utilizaron la prueba LDBIO según las recomendaciones del prospecto del kit.

Se determinó sensibilidad en 113 pacientes que presentaban una toxoplasmosis ocular clínicamente probada. Se calculó la especificidad en una población control que presentaba una afección ocular diferente de la infección toxoplásmica: toxocariasis ocular (n=5), infección vírica (n=10), otras infecciones (n=4), afecciones oculares no infecciosas (n=126) que incluían cataratas (n=42).

Sensibilidad (Se)

La sensibilidad global de CIP-WB IgG es del **62,8 %** (n=113), rendimiento comparable al GWC (Se=61,0 %, N=113) y superior a la PCR (Se=43,5 %, n=92, p=0,0028).

La asociación de CIP-WB al GWC y a la PCR permite mejorar la sensibilidad del diagnóstico:

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

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

Especificidad (Sp)

La especificidad global de CIP-WB IgG es del **92,8 %** (n=111), rendimiento comparable al GWC (Sp=94,2 %, n=139) e inferior a la PCR (Sp=100 %, n=131, p=0,0009).

La asociación de las dos técnicas, CIP-WB IgG + GWC, reduce un poco la especificidad del diagnóstico (Sp=91,1 %, n=101, p=0,32). La asociación a la PCR no influye en la especificidad.

Conclusión

El inmunoensayo de **Toxoplasma WB IgG IgM** tiene un excelente rendimiento en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita u ocular.

En la toxoplasmosis congénita, el CIP-WB G+M tiene una sensibilidad del **76%** [95CI 62-86%] y una especificidad del **100%** [95CI 92-100%] al nacer. Realizar pruebas en el primer mes de vida aumenta aún más la sensibilidad del CIP-WB G+M.

En la toxoplasmosis ocular, el CIP-WB IgG tiene una sensibilidad de **62.8%** [95CI 53.2-71.6%] y una especificidad de **92.8%** [95CI 85.9-96.6%]. La combinación con otras técnicas (GWC y/o PCR) aumenta el rendimiento del diagnóstico.

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, ictericos o lipídicos, se recomienda interpretar los resultados a partir del uso cauteloso de dichas muestras.

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 de la inmunotransferencia.

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 amortiguador 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.

BIBLIOGRAFIA

Fekkar, A. *et al.* Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1965–1967 (2008).

- Garweg, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* **27**, 61–68 (2005).
- Garweg, J. G., de Groot-Mijnes, J. D. F. & Montoya, J. G. Diagnostic Approach to Ocular Toxoplasmosis. *Ocular Immunology and Inflammation* **19**, 255–261 (2011).
- Garweg, J. G., Garweg, S.-D. L., Flueckiger, F., Jacquier, P. & Boehnke, M. Aqueous humor and serum immunoblotting for immunoglobulin types G, A, M, and E in cases of human ocular toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4593–4598 (2004).
- Goldmann, H. & Witmer, R. [Antibodies in the aqueous humor]. *Ophthalmologica* **127**, 323–330 (1954).
- L'ollivier, C. *et al.* Comparison of Mother and Child Antibodies That Target High-Molecular-Mass *Toxoplasma gondii* Antigens by Immunoblotting Improves Neonatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1326–1328 (2012).
- Maenz, M. *et al.* Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* **39**, 77–106 (2014).
- Magi, B. & Migliorini, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol.* **34**, 93–95 (2011).
- Pinon, J. M. *et al.* Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2267–2271 (2001).
- Potasman, I., Araujo, F. G. & Remington, J. S. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 1050–1054 (1986).
- Remington, J. S., Thulliez, P. & Montoya, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 941–945 (2004).
- Rilling, V., Dietz, K., Krczal, D., Knotek, F. & Enders, G. Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 174–180 (2003).
- Robert-Gangneux, F. *et al.* Usefulness of immunoblotting and Goldmann-Witmer coefficient for biological diagnosis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 34–38 (2004).
- Robert-Gangneux, F. & Darde, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 264–296 (2012).
- 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).

NOTIFICACION DE ACTUALIZACION: lea atentamente

FECHA DE LANZAMIENTO	VERSIÓN	RESUMEN DE MODIFICACIONES
26/07/2021	Vs 18	Eliminación de la advertencia de seguridad R5 - Dirección de correo electrónico de contacto – NaN3 EUH 032.
25/07/2022	Vs 19	R6 sin NaN3. Tira identificada con la letra A. Posible uso de reactivos de diferentes lotes.
30/11/2022	Vs20	Nueva dirección - Corrección de traducción



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