

TOXOPLASMA

Western blot IgG IgM

CE0459

Immunoblot-Assay für
die *In-vitro*-Diagnostik



#TOP-WB24GM : 24 tests

#TOP-WB12GM : 12 tests

#TOP-WB96GM : 96 tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Verwendungszweck

TOXOPLASMA WB IgG-IgM ist ein Vergleichstest (CIP-WB) der immunologischen Profile IgG und IgM mittels Immunoblot-Assay, der zur Diagnose folgender Erkrankungen bestimmt ist:

- Kongenitale Toxoplasmose bei der Geburt (T0): CIP-WB G+M zwischen dem mütterlichen Blut und dem Nabelschnurblut.
- Kongenitale Toxoplasmose während der postnatalen Nachsorge (T+N): CIP-WB G+M zwischen dem Nabelschnurblut zum Zeitpunkt T0 und dem Blut des Kindes zum Zeitpunkt T+N.
- Okuläre Toxoplasmose: CIP-WB IgG zwischen dem Serum des Patienten und dem Kammerwasser.

Dieser Test ist nicht zur Erkennung oder Bestätigung isolierter Serologien bestimmt. Für diese Anwendung ist der Test LDBIO TOXO II IgG (Ref. TOXO II IgG WB) vorgesehen.

Testprinzip

Westernblot-Technik: Die Antigene von *Toxoplasma gondii* werden nach der Trennung durch Elektrophorese mittels Elektroblothing an die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran gebunden (Transfer genannt), die in 24 von 1 bis 24 nummerierte Streifen geschnitten wird.

Durchführung des Tests:

Anmerkung: Die IgG, IgM oder IgA Immunoblot Tests werden bei der Anwendung zeitgleich durchgeführt.

- Immunoblot IgG :

Der Test besteht in der separaten Inkubation der Serumproben (oder Kammerflüssigkeit), deren immunologischen Profile verglichen werden sollen, **mit aneinander grenzenden Streifen, die aus demselben Transfer** stammen.

Schritt 1: Jede zu prüfende Serumprobe (oder Kammerflüssigkeit) wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Toxoplasma*-Antikörper binden selektiv an die Antigene von *T. gondii*.

Schritt 2: : Das alkalische Phosphatase **Anti-Human-IgG**-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Toxoplasma*-Antikörper.

Schritt 3: Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Toxoplasma*-Antikörpern **der Klasse IgG** erkannten Antigene werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

- Immunoblot IgM:

Der Test ist seinem Prinzip nach identisch, in Schritt 2 wird das oben erwähnte Konjugat durch ein Alkalische Phosphatase - **Anti-Humanes IgM-Konjugat** ersetzt. Die Ermittlung wird folglich die Antigen-Banden nachweisen, die durch die in den Proben vorhandenen Toxoplasma-Antikörper **der Klasse IgM** erkannt werden.

- Auswertung:

Der aufeinanderfolgende Vergleich der Streifen-Paare IgG und IgM ermöglicht das Feststellen des eventuellen Vorhandenseins von Banden, die sich nur in einer der Proben entwickeln, und nicht in der anderen (vgl. § Auswertung).

Im Kit enthaltene Reagenzien

kursiv: Packung mit 12 Tests (#TOP-WB12GM) - fett: Packung mit 96 Tests (#TOP-WB96GM).

| ID | Menge | Beschreibung | Zusammensetzung |
|----|-------|--|--|
| R1 | 1 | Block/Blöcke mit 24 (<i>12, 4 x 24</i>) STREIFEN: vorgeschchnittener + gefärbter Standard. (Jeder Block und jeder Transfer sind mit einer eigenen einzigartigen Seriennummer gekennzeichnet) | Sensibilisierte Nitrocellulose. Gefärbtes Molekulargewicht (kDa): Blau: 250, Blau: 150, Blau: 100, Rosa: 75, Blau: 50, Grün: 37, Rosa: 25, Blau: 20, Blau: 15. |
| R2 | 1 | Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) ml PROBENPUFFER (Gebrauchsfertig – rosafarbene Lösung). | Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %). |
| R3 | 1 | Fläschchen mit 30 (<i>30, 60</i>) ml ANTI-IgG-KONJUGAT (Gebrauchsfertig – blaue Lösung). | Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren. |

| | | | |
|----|---|--|--|
| R4 | 1 | Fläschchen zu 30 (30, 60) ml ANTI-IgM KONJUGAT (Gebrauchsfertig - gelb Lösung). | Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera, konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (unter 0,1 %) + Stabilisatoren. |
| R5 | 1 | Fläschchen mit 30 (30, 125) ml SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen). | Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren. |
| R6 | 1 | Fläschchen mit 60 (60, 250) ml WASCHKONZENTRAT 10X PUFFER (<u>Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden – farblose Lösung.</u>) | Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %). |

R2, R3, R5 und R6 sind Bestandteil aller Kits und weisen eine eigene einzigartige Chargennummer auf, die nur vom jeweiligen Produktionsdatum abhängt. Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

Zusätzlich erforderliches Material, das nicht im Lieferumfang enthalten ist

- Multikanal-Polypropylen-Inkubationswannen für Mini-Blots (#WBPP-08 oder gleichwertig).
- Wippschüttler für Immunoblots, Vakuumsystem für Flüssigkeiten (die von uns gelieferten #WBPP-08-Wannen können durch einfaches Umdrehen geleert werden).
- Röhrchen und Material zur Probenahme, Messzylinder, angepasste Behälter. Automatische Pipetten, Mikropipetten und Einwegspitzen (Mengen von 10 µl, 25µl, 1,2 ml und 2 ml).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser. Saugpapier (z. B. Whatman Filterpapier), transparentes Klebeband.
- Latexhandschuhe, Pinzetten zur Handhabung der Streifen, Cutter oder Skalpell, flaches transparentes Lineal.

Hinweis: Unsere Reagenzien können in einem automatisierten Immunoblot-Prozessor verwendet werden. **Es sollte darauf geachtet werden, dass keine chemischen Kontaminationen unserer Reagenzien auftreten, wenn im Prozessor auch Reagenzien anderer Hersteller verwendet werden** (bekanntes Beispiel: Kontamination durch TWEEN 20), und keine bakteriellen Kontaminationen. Fläschchen für den Prozessor reservieren. Nach der Verarbeitung dürfen Reste verwendeter Reagenzien nicht zurück in die Originalfläschchen gegeben werden.

Lagerung und Stabilität

Zwischen 2 und 8 °C lagern. Die Reagenzien des Kits sind bis zum auf der Außenverpackung und den Fläschchenetiketten angegebenen Ablaufdatum stabil. 1/10 verdünnter Waschpuffer bleibt bei +2 bis +8 °C zwei Monate und bei Raumtemperatur eine Woche stabil.

Warnhinweise für den Gebrauch

Sicherheit

- Nur für *In-vitro*-Anwendung. Entsprechend der Guten Laborpraxis handhaben und jedes Reagenz und jede Probe als potenziell toxisch und/oder infektiös behandeln.
- Laborkittel, Handschuhe und Brille tragen; im Labor nicht trinken, essen oder rauchen. Pipetten nicht mit dem Mund handhaben.
- Das Substrat enthält eine Mischung aus NBT und BCIP und wirkt bei Kontakt (Haut und Schleimhäute) und Inhalation toxisch.

- Die Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei und Kupfer explosive Metallsalze bilden kann. Verschüttungen mit Wasser reinigen.
- Abfall (Proben, Spitzen, Röhrchen, Waschflüssigkeit, gebrauchtes Reagenz...) gemäß guter Praxis der Branche und aktuellen nationalen Bestimmungen entsorgen.

Vorsichtsmaßnahmen

- Keine flüssigen Reagenzien aus verschiedenen Chargen zusammen verwenden.
- Die Streifen in numerischer Reihenfolge verwenden. Streifen mit verschiedener Seriennummer nicht mischen; die Transfers der Reihe nach verwenden. Vor Testbeginn sollte ein spezifischer Aufteilungsplan erstellt werden.
- Die Streifen nicht mit den Fingern berühren; eine Pinzette verwenden.
- Die Reagenzien müssen vor der Verwendung gut vermischt werden, insbesondere der konzentrierte Waschpuffer.
- Die Fläschchen nach der Verwendung verschließen; nicht verwenden, wenn versehentlich eine Substanz in die Reagenzien gelangt ist. Reagenzien aus Fläschchen, die Anzeichen ausgelaufenen Materials aufweisen, nicht verwenden. Trübe oder ausgefällte Lösung nicht verwenden.
- Nur Einwegpipettenspitzen verwenden. Kontamination zwischen den Kanälen vermeiden. Darauf achten, ob sich in den Pipettenspitzen Schaum oder Bläschen bilden (bakterielle Kontamination der Reagenzfläschchen).
- Inkubationswannen nur mit klarem Wasser reinigen, gefolgt von destilliertem Wasser (niemals Detergenzien oder Bleichmittel verwenden).
- Das Auslassen einer Probe oder die Zugabe einer ungeeigneten Menge kann unabhängig vom tatsächlichen Status zu einem negativen Testergebnis führen.

Probenahme

Die Proben aseptisch in trockenen Röhrchen sammeln. Es sind mindestens 35 µl Serum und 10 µl Kammerflüssigkeit erforderlich. Im Fall von Kammerflüssigkeit erhöht die Verwendung von 25 µl die Sensitivität des Tests.

Die Proben bis zur Verarbeitung bei 2-8 °C aufbewahren. Wenn sie gelagert werden müssen, die Proben bei -20 ± 5 °C einfrieren. Keine kontaminierten Proben verwenden. Die Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer: Für 4 Tests in einer sauberen Flasche müssen 10 ml Waschkonzentrat 10X (**R6**) in 90 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden.

Testverfahren

Anmerkung: Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

1. Den Aufteilungsplan der Proben sorgfältig erstellen. **Es ist zwingend erforderlich, den Vergleich an einem Probenpaar mithilfe aneinander grenzender Streifen (fortlaufende Nummern), die aus demselben Transfer stammen (gleiche Seriennummer) durchzuführen.** Der Vergleich von Streifen

mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. Es ist gefährlich (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

2. Mit einem Skalpell und einem sauberen und trockenen, flachen, transparenten Lineal die erforderliche Anzahl Streifen (R1) zurechtschneiden, wobei die blaue Positionierungslinie auf den Streifen erhalten bleibt: die Streifen mit dem Lineal festhalten und auf der Seite mit dem Stamm schneiden (die Nummern sind durch das Lineal zu sehen).
3. 1,2 ml des Probenpuffers (R2) gemäß dem erstellten Plan in jeden Kanal verteilen.
4. Die nummerierten Streifen in numerischer Reihenfolge in den Kanälen platzieren: Die Streifen für ca. 1 Minute mit oben sichtbarer Nummer rehydrieren lassen. Hierzu wird die Wanne leicht geschwenkt, damit sie vollständig in den Puffer eintauchen.
5. Die Proben nach dem erstellten Aufteilungsplan (Schritt 1) und nach den unten angegebenen Mengen verteilen:

| | Serum | Kammerflüssigkeit |
|-----|-------|-------------------|
| IgG | 10µl | 10 oder 25µl |
| IgM | 25µl | - |

Im Fall von Kammerflüssigkeit erhöht die Verwendung von 25 µl die Sensitivität des Tests.

Die Wanne nach jeder Dosierung leicht schütteln. Die Wanne auf einen Wippschüttler stellen. **Für 90 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.

6. Waschschrift: Den Inhalt des Kanals mit einer Pasteurpipette oder durch Umdrehen der Inkubationswanne entleeren. 2 bis 3 ml verdünnten Waschpuffer in jeden Kanal geben. Auf dem Wippschüttler für 3 Min. inkubieren. Zweimal wiederholen, dann den Inhalt der Kanäle entleeren. Sicherstellen, dass sich die Streifen während dieser Schritte nicht umdrehen.
7. Gemäß dem erstellten Aufteilungsplan 1,2 ml des Anti-IgG Konjugats (R3) oder 1,2 ml des Anti-IgM Konjugats (R4) jeweils in den entsprechenden Kanal geben. Die Wanne auf den Wippschüttler stellen. **Für 60 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.
8. Waschschrift: Schritt 6 wiederholen.
9. 1,2 ml NBT/BCIP-Substrat (R5) in jeden der Kanäle geben. Auf den Wippschüttler stellen und vor direkter Lichteinstrahlung schützen. **Für 60 Min.** ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.

Unabhängig vom Parameter die Farbentwicklung überwachen. Die Entwicklung kann beendet werden, wenn die Hintergrundfarbe des Streifens so dunkel wird, dass Ablesen schwierig wird (die Qualität der Waschschrift hat einen grundlegenden Einfluss auf die Einfärbung des Hintergrunds). **Es muss beachtet werden, dass die Streifen beim Trocknen heller werden.**

- Es ist unerlässlich, die Entwicklung der 2 Streifen desselben Paares für dieselbe Antikörper-Unterkategorie zur selben Zeit zu beenden, doch die Untersuchung der IgG oder IgM kann unabhängig voneinander beendet werden. (Die IgM zeigen sich normalerweise langsamer als die IgG, da sie in schwächerer Konzentration vorhanden sind.)
- Die Konzentration von IgM im Serum eines Kindes ist normalerweise geringer. Die korrekte Entwicklung der Reaktion erfordert etwas mehr Geduld, und man sollte sich nicht dadurch verunsichern lassen, dass der mütterliche IgM Streifen etwas dunkler wird.
- Die Konzentration der Antikörper im Kammerwasser ist normalerweise geringer. Die korrekte Entwicklung der Reaktion erfordert etwas mehr Geduld, und man sollte sich nicht dadurch verunsichern lassen, dass die Serumstreifen etwas dunkler werden.

10. Die Reaktion wird durch Absaugen des Substrats mit einer Pasteurpipette oder Umdrehen der Inkubationswanne und Hinzufügen von 2 ml destillierten Wassers in die Kanäle gestoppt. Dieser letzte Waschschrift wird noch einmal wiederholt.
11. Trocknen der Streifen: Während die Kanäle noch mit Wasser gefüllt sind, werden die Streifen mit der Pinzette am nummerierten Ende herausgenommen und so, dass die Nummer sichtbar ist, auf Whatman Saugpapier gelegt. An der Luft trocknen lassen. Die Farbe der Streifen wird beim Trocknen natürlicherweise heller. Die Auswertung darf erst stattfinden, wenn die Trocknung abgeschlossen ist.
12. Lagerung: Die Streifen auf ein Blatt Papier legen, auf dem sie archiviert werden.

- Die IgG und IgM Streifen jedes Probenpaars paarweise in aufsteigender numerischer Reihenfolge und gemäß dem erstellten Aufteilungsplan (Schritt 1) nebeneinander anordnen.
- Die Streifen exakt an der Positionierungslinie ausrichten.
- Mit dem flachen Lineal in 2er-Gruppen fixieren und oben mithilfe eines transparenten Klebebands befestigen.

Es ist zwingend erforderlich, den Vergleich an einem Probenpaar mithilfe aneinander grenzender Streifen (fortlaufende Nummern), die aus demselben Transfer stammen (gleiche Seriennummer) durchzuführen. Der Vergleich von Streifen mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. **Es ist gefährlich** (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

Auswertung

Beschreibung der Banden:

Eine positive Probe kann zahlreiche Banden zwischen 15 und 200 kDa aufweisen. Nur die Banden mit einer Molekülmasse unter 120 kDa können zum Vergleich der Profile eingesetzt werden.

1- Auswertung : CIP WB G+M (Kongenitale Toxoplasmose)

- **Bei der Geburt (Paare Mutter / Kind):**

Die IgG und IgM Streifen unabhängig voneinander vergleichen.

Die 2 aneinandergrenzenden Streifen gleichzeitig von oben nach unten auswerten und dabei jedes im Nabelschnurblut **vorhandene und im mütterlichen Serum nicht vorhandene** Antigen-Band festhalten.

Jedes in gut definierter Auflösung erscheinende Band mit einer Molekülmasse (MG) unter 120 kDa, das *ausschließlich beim Kind vorhanden ist*, beweist die Bildung von Toxoplasmose-Antikörpern durch das Kind, was für eine kongenitale Toxoplasmose spricht.

- **Bei der postnatalen Nachsorge (Paare Kind T0 / Kind T+N):**

Die IgG und IgM Streifen unabhängig voneinander vergleichen.

Die 2 aneinandergrenzenden Streifen gleichzeitig von oben nach unten auswerten und dabei jedes im Serum T+N **vorhandene und im Nabelschnurblut nicht vorhandene** Antigen-Band festhalten.

Jedes in gut definierter Auflösung erscheinende Band mit einer Molekülmasse (MG) < 120 kDa, das *ausschließlich zum Zeitpunkt T+N vorhanden ist*, beweist die Bildung von Toxoplasmose-Antikörpern, was für eine kongenitale Toxoplasmose spricht.

Anmerkung: Die Indikation des CIP-WB IgG/IgM in der postnatalen Nachsorge wurde für den IgG-Nachweis bewusst auf 3 Monate und für den IgM-Nachweis auf 1 Monat beschränkt.

Anmerkungen : Die Gegenüberstellung des farbigen Standards der Molekülmassen (Hülle R1) ermöglicht die Schätzung des MG der ermittelten Antigen-Banden. (Er muss vorher mithilfe eines Lineals und eines Skalpells wie ein gewöhnlicher Streifen zugeschnitten und mit einer Pinzette gehandhabt werden.)

A - NEGATIVER CIP
(nicht- infiziertes Kind)

B - POSITIVER CIP
(infiziertes Kind)

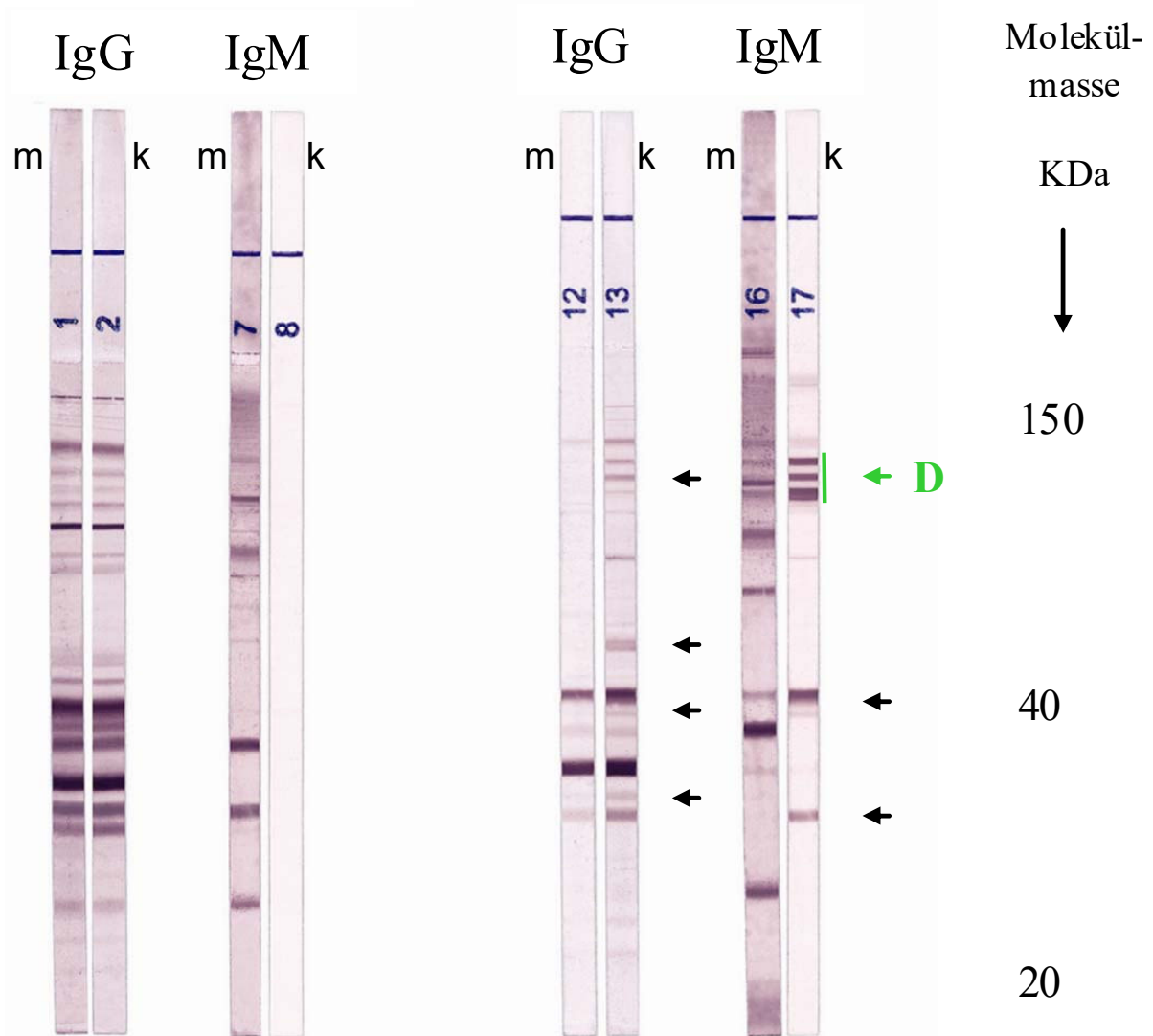


Abb. 1: Kongenitale Toxoplasmose Beispiele positiver und negativer Ergebnisse

Das Paar Mutter-Kind (A) entspricht einer während der Schwangerschaft infizierten Mutter, deren Kind gesund ist: Die IgG Profile sind vollkommen identisch (übertragene IgG). Das Kind weist auf den IgG und / oder IgM Streifen kein zusätzliches Band auf: **DER CIP-WB IST NEGATIV.**

Das Paar (B), kongenitale Toxoplasmose, entspricht einer während der Schwangerschaft infizierten Mutter, deren Kind ebenfalls infiziert ist. Außer den übertragenen Antikörpern erkennt man auf den Streifen des Kindes einwandfrei das Vorhandensein zusätzlicher IgG und oder IgM Banden (D), was den durch das Kind neu gebildeten Antikörpern entspricht: **DER CIP-WB IST POSITIV.**

3. Das Aussehen der Banden kann sehr unterschiedlich sein: dünn, breit, mehr oder weniger farbig, intensiv...
- Bei der Aufnahme dieses Verfahrens wird empfohlen, einige Profil-Vergleiche an bekannten Probenpaaren durchzuführen, um sich mit der Auswertungsart vertraut zu machen.
- Außerdem wird empfohlen, zunächst zwei Personen im Labor unabhängig voneinander den CIP-WB auswerten zu lassen. Bei nicht übereinstimmender Auswertung muss ein Kontroll-CIP-WB durchgeführt werden.
4. Die Antigenfraktionen mit sehr hoher Molekülmasse (MG) erscheinen sehr eng konzentriert am oberen Ende des Streifens, damit die Fraktionen mit mittlerer und niedriger Molekülmasse in besserer Auflösung angezeigt werden können. Die Banden mit einem MG > 120 kDa sind deshalb für die Auswertung des Tests unbrauchbar: Die Proben, die ausschließlich solche Profilunterschiede aufweisen, können nicht als positiv eingestuft werden.
5. Im Gegensatz dazu wird auf den positiven CIP WB IgM Proben (bei kongenitaler Toxoplasmose) sehr häufig ein „dreifaches Band“ (drei sehr leicht erkennbare Banden) zwischen 75 und 100 kDa vorgefunden (vgl. „D“ Abb. 1 Streifen Nr. 17 rechts).
6. Bei der Geburt (kongenitale Toxoplasmose) muss insbesondere jede allgemeine Verstärkung der Intensität der Banden (Hämokonzentration), die mit zusätzlichen Banden im Nabelschnurblut verwechselt werden können, kritisch betrachtet werden. Serumproben, die ausschließlich solche Profilunterschiede aufweisen, werden als negativ eingestuft.
7. Im Gegensatz dazu wird (kongenitaler Toxoplasmose, okuläre Toxoplasmose) eine deutliche Verstärkung (häufig in der Breite oder in der Intensität) von einem oder zwei isolierten Banden, während alle anderen Banden die gleiche Intensität haben oder schwächer ausgeprägt sind, als Kriterium eines positiven Ergebnisses betrachtet.
8. Natürliche Antikörper (kongenitale Toxoplasmose):
 Das Immunoblot-Assay Verfahren ist besonders sensibel und das für den CIP WB Test eingesetzte Antigen wurde ausgewählt, weil es das Erscheinen einer Vielzahl von Banden auf den Streifen bewirkt. Zahlreiche Publikationen befassen sich mit Banden, die mittels Immunoblot-Assay bei Menschen festgestellt wurden, bei denen nie ein Verdacht auf Toxoplasmose bestanden hat. Diese Antikörper (IgG und IgM) werden durch die anderen Verfahren nur selten festgestellt, durch Immunoblot-Assay aber sehr häufig. Ein Grund dafür könnten Kreuzreaktionen mit Antikörpern sein, die sich gegen noch nicht bestimmte natürliche Immunogene richten. [15, 16, 18]
 Aus diesem Grund ist die Indikation des Tests TOXOPLASMA WB IgG-IgM dem Profil-Vergleich vorbehalten. (Zur Bestätigung der serologischen IgG-Befunde nur den LDBIO TOXO II IgG Test verwenden, der für diesen Zweck vorgesehen und spezifisch ist.)
 Neugeborene weisen keine natürlichen Antikörper auf (abgesehen von den übertragenen mütterlichen Antikörpern), aber die Wahrscheinlichkeit des Auftretens natürlicher Antikörper steigt mit zunehmendem Alter des Säuglings ab dem 3. Lebensmonat, doch werden sie im Alter zwischen 3 und 6 Monaten nur selten vorgefunden. [15]
 Aus diesem Grund wurde die Indikation des CIP-WB IgG/IgM in der postnatalen Nachsorge bewusst auf 3 Monate für IgG und auf 1 Monat für IgM begrenzt: Das Auftreten unspezifischer Banden erfolgt bei den IgM-Antikörpern tatsächlich frühzeitiger.
9. „Hitzeschockproteine“ (kongenitale Toxoplasmose):
 Ein unspezifisches dünnes Band von schwacher, aber veränderlicher Intensität kann bei IgM-Antikörpern im Bereich von 37 kDa auftreten. Es handelt sich hierbei um ein Artefakt in Verbindung mit der Vorbereitung des Antigens, das als „Hitzeschockprotein“ bezeichnet wird. Auch wenn es auf beiden Streifen des Paares Mutter-Kind zugleich auftritt, kann es bei manchen Serumproben im Rahmen der Untersuchung des Kindes gelegentlich ausgeprägter sein. Dieses Band nicht berücksichtigen.
10. CIP WB (Okuläre Toxoplasmose): Der CIP-WB IgM Test ist nicht für die Diagnose der okulären Toxoplasmose einsetzbar.

Leistung

Spezifität - Sensitivität:

Diese Studien wurden von unabhängigen Referenzlaboren durchgeführt.

1/ CIP-WB G+M : KONGENITALE TOXOPLASMOSE bei der Geburt (Mutter / Kind)

| | | TOXOPLASMA WB IgG-IgM | |
|-----------------|-------------|-----------------------|-----|
| | | POS | NEG |
| KLINISCHE DATEN | KT POS n=54 | 41 | 13 |
| | KT NEG n=60 | 0 | 60 |

Table. 1: Leistungsfähigkeit des CIP-WB IgG/IgM Tests bei der Geburt (n=114):

- Spezifität = 100 %
- Sensitivität = 76 %
- Positiver prädiktiver Wert = 100 %
- Negativer prädiktiver Wert = 83 %

2/ CIP-WB G+M : KONGENITALE TOXOPLASMOSE in der postnatalen Nachsorge (Kind T0/ T20)

Von den 54 zuvor zum Zeitpunkt T0 getesteten Kindern (*Abb. 1*) wurden 10 gesunde Kinder und 12 infizierte Kinder (n=22) zum Zeitpunkt T20 erneut untersucht, und eine retrospektive Analyse mit dem Test TOXOPLASMA WB IgG-IgM wurde durchgeführt.

Zeitpunkt T0: 4 von 12 infizierten Kindern wiesen bei der Geburt kein abweichendes Profil auf (falsch negatives Ergebnis).

Zeitpunkt T20: 1 einziges bleibt negativ.

| | | TOXOPLASMA WB IgG-IgM | |
|-----------------|-------------|-----------------------|-----|
| | | POS | NEG |
| KLINISCHE DATEN | KT POS n=12 | 11 | 1 |
| | KT NEG n=10 | 0 | 10 |

Table 2: Leistungsfähigkeit des CIP-WB IgG/IgM zum Zeitpunkt T20 (n = 22):

- Spezifität = 100 %
- Sensitivität = 92 %
- Positiver prädiktiver Wert = 100 %
- Negativer prädiktiver Wert = 91 %

3/ CIP WB IgG : OKULÄRER TOXOPLASMOSE (Serum / Kammerwasser)

Die unten angeführten Leistungen stammen aus der Metaanalyse von vier Studien, die von Referenzzentren veröffentlicht wurden [1; 13; 16; 19].

Diese Studien vergleichen die Leistungen des CIP-WB IgG mit jenen des Goldmann-Witmer-Koeffizienten (GWK) und der PCR. Sie zeigen auch die diagnostischen Leistungen, die mithilfe der Kombination aus zwei oder drei dieser Methoden erzielt werden können.

Alle vier Studien verwendeten den LDBIO-Test in Übereinstimmung mit den Empfehlungen aus der dem Kit beigelegten Gebrauchsanweisung.

Bei 113 Patienten, die eine klinisch nachgewiesene das Auge betreffende Toxoplasmose zeigten, wurde die Sensitivität untersucht. Die Spezifität wurde in einer Kontrollpopulation berechnet, die eine andere Augenerkrankung als Toxoplasmoseinfektion aufwies: das Auge betreffende Toxocariasis (n=5), Virusinfektion (n=10), andere Infektionen (n=4), nicht-infektiöse Augenerkrankungen (n=126), darunter Katarakt (n=42).

Sensitivität (Se):

- Die allgemeine Sensitivität des CIP-WB IgG liegt bei 62,8 % (n=113), eine Leistung, die mit dem GWK (Se=61,0 %, n=113) vergleichbar ist und über jener der PCR (Se=43,5 %, n=92, p=0,0028) liegt.
- Die Kombination des CIP-WB mit dem GWK und der PCR verbessert die Sensitivität der Diagnose.
 - CIP-WB + GWK: Se=78,1 % (n=96, p=0,0082)
 - CIP-WB + GWK + PCR: 86,3 % (n=95, p=0,0001)

Spezifität (Sp):

- Die allgemeine Spezifität des CIP-WB IgG liegt bei 92,8 % (n=111), eine Leistung, die mit dem GWK (Sp=94,2 %, n=139) vergleichbar ist und unter jener der PCR (Sp=100 %, n=131, p=0,0009) liegt.
- Die Kombination der beiden Methoden, CIP-WB IgG + GWK, verringert die Spezifität der Diagnose leicht (Sp=91,1 %, n=101, p=0,32). Die Kombination mit der PCR hat keinen Einfluss auf die Spezifität.

Reproduzierbarkeit:

Es wurde die Reproduzierbarkeit zwischen Serien und Chargen geprüft. In beiden Fällen ist die Korrelation hinsichtlich der spezifischen Banden zwischen Sera sehr gut.

Beeinträchtigung:

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierten, ikterischen oder lipidischen Sera beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben aufmerksam zu beobachten.

Fehlerbehebung

„**Die Banden sind blass und weisen kaum Kontrast auf**“: Bestimmte Sera mit niedrigen Konzentrationen von Antikörpern können solche Ergebnisse zeigen.

„**Es sind schattierte Bereiche sichtbar, mehr oder weniger farbig, leicht diffus**“: Der Streifen wurde in eins der Reagenzien nicht vollständig eingetaucht und wurde nicht über seine gesamte Länge korrekt inkubiert. Es können auch Flecken an den Stellen vorhanden sein, an denen die Probe platziert wurde, wenn die Wanne anschließend nicht geschüttelt wurde.

„**Der Hintergrund ist dominant, wodurch das Ablesen sehr schwer wird**“: Die Waschungen waren unzureichend oder die letzte Inkubation zu lang. Gute Techniken zur Testleistung sicherstellen, die Waschzeiten einhalten und die Wasserqualität sicherstellen. Die Zeit der letzten Inkubation reduzieren. In Ausnahmefällen können bestimmte Sera unspezifisch reagieren. Dann ist das Ergebnis des Immunoblots unbrauchbar.

Dieser unspezifische, dominante Hintergrund kann nur einen Teil des Streifens betreffen und somit können nur hier die Ergebnisse nicht ausgewertet werden.

„**Während des letzten Entwicklungsschritts erscheint eine Ausfällung in der Lösung**“: das Substrat kann tatsächlich zum Ende der Entwicklung im Puffer teilweise ausfallen (schwarze Flocken). Dieses Phänomen verändert die Qualität der Entwicklung nicht, die normal fortgesetzt werden sollte. Die letzte Waschung mit destilliertem Wasser entfernt möglicherweise vorhandene feste Partikel.

Literaturverzeichnis

1. 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).
2. Garweg, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol.* **27**, 61–68 (2005).
3. 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).
4. 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).
5. Goldmann, H. & Witmer, R. [Antibodies in the aqueous humor]. *Ophthalmologica* **127**, 323–330 (1954).
6. 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).
7. Maenz, M. *et al.* Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. *Prog Retin Eye Res* **39**, 77–106 (2014).
8. Magi, B. & Migliorini, L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol.* **34**, 93–95 (2011).
9. 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).
10. Potasman, I., Araujo, F. G. & Remington, J. S. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 1050–1054 (1986).
11. Remington, J. S., Thulliez, P. & Montoya, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 941–945 (2004).
12. 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).
13. 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).
14. Robert-Gangneux, F. & Darde, M.-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* **25**, 264–296 (2012).
15. 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).
16. 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).
17. 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).
18. 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).
19. 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).
20. Villard, O. *et al.* Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2015).