

TOXOPLASMA

Western blot IgG IgM

Analisi immunoblot per uso
diagnostico *in vitro*

CE0459



#TOP-WB24GM : 24 test

#TOP-WB12GM : 12 test

#TOP-WB96GM : 96 test

ISTRUZIONI PER L'USO

Destinazione d'uso

TOXOPLASMA WB IgG-IgM è un test di immunoblot di confronto dei profili immunologici (CIP-WB) IgG e IgM per la diagnosi di:

- Toxoplasmosi congenita alla nascita (G0): CIP-WB G+M tra sangue materno e il sangue del cordone ombelicale.
- La toxoplasmosi congenita nel follow-up post-natale (G + N): CIP-WB G+M tra il sangue del cordone al giorno G0 e il sangue del bambino a G + N.
- La toxoplasmosi oculare: CIP-WB IgG tra il siero del paziente e l'umore acqueo.

Questo test non è destinato al test diagnostico o alla conferma di sierologie isolate. Per questa applicazione, utilizzare il test LDBIO TOXO II IgG (Ref. TOXO II IgG WB).

Principio del test

La tecnica Western Blot: gli antigeni della *Toxoplasma gondii*, dopo l'isolamento mediante elettroforesi, con l'esecuzione dell'elettroblot si legano alla superficie della membrana di nitrocellulosa (denominata transfer) suddivisi in 24 strisce numerate da 1 a 24.

Principio del test:

Nota: Il test immunoblot IgG e IgM descritti di seguito vengono eseguiti simultaneamente al momento della manipolazione.

- Immunoblot IgG:

Il test consiste nell'incubare separatamente, **2 strisce contigue della stessa confezione di strisce**, i

due campioni (sieri, umor acqueo) di cui si vogliono confrontare i profili immunologici.

Passo 1: Ciascun campione di siero (o umor acqueo) da analizzare viene incubato separatamente con una striscia. Gli anticorpi anti *-Toxoplasma*, potenzialmente presenti nel campione, si legano in modo selettivo agli antigeni della *T. gondii*.

Passo 2 : **Le IgG umane** coniugate a fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi anti-*toxoplasma*..

Passo 3 : Gli immunocomplessi formati reagiscono con il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi *anti-toxoplasma di classe IgG* presenti nel campione appaiono come strisce trasversali di colore viola.

- Immunoblot IgM:

Il test è identico in linea di principio, sostituendo al punto 2 il coniugato precedente con un coniugato fosfatasi alcalino - **anti-IgM umano**. La rivelazione metterà quindi in evidenza le bande antigeniche riconosciute dagli anticorpi anti-toxoplasma **di classe IgM** presenti nei campioni.

- Lettura:

Il successivo confronto delle coppie di strisce IgG e successivamente IgM consente di rilevare l'eventuale presenza di bande rivelate unicamente da uno dei campione e non dall'altro (cf. § Interpretazione).

Reagenti forniti con il kit

Corsivo: confezione da 12 test (#TOP-WB12G) - **Grassetto**: Confezione da 96 test (#TOP-WB96G).

Cod.	Q.tà	Descrizione	Composizione
R1	1	Confezione da 24 (12, 4x24) STRISCE: standard pretagliate + colorate. (Ogni cartella e ogni adesivo sono identificati da un numero di serie univoco)	Nitrocellulosa sensibilizzata. Peso molecolare colorati (kDa): blu: 250, blu: 150, blu: 100, rosa: 75, blu: 50, verde: 37, rosa: 25, blu: 20, blu: 15.
R2	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di BUFFER DILUENTE SIERI (pronto all'uso, soluzione rosa).	Buffer + tensioattivo + NaN3 (<0,1%).
R3	1	Fiala/e da 30 (30, 60) ml di CONIUGATO ANTI IgG (pronto all'uso, soluzione blu).	Buffer + sieri policlonali di capra con anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.
R4	1	Flaconi(i) da 30 (30, 60)ml di CONIUGATO ANTI-IgM (pronto all'uso - soluzione giallo).	Buffer + siero policlonali di capra anti-IgM umani coniugato con la fosfatasi alcalina + NaN3 (< 0.1%) + stabilizzanti.
R5	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di SUBSTRATO (pronto all'uso, fiala marrone opaca).	Buffer + NBT + BCIP + stabilizzatori.
R6	1	Fiala da 60 (60, 250) ml di 10 SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA (da diluire in 10 parti di acqua distillata; soluzione incolore).	Buffer + tensioattivo + NaN3 (<0,1%).

R2, R3, R5 e R6 sono uguali per tutti i kit e hanno un unico numero di lotto che dipende esclusivamente dalla data di produzione. Si raccomanda di eseguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

Altro materiale richiesto non incluso nella fornitura

- Vassoi di incubazione multi-canale in polipropilene per miniblot (#WBPP-08 o equivalenti).
- Piattaforma oscillante per immunoblot, sistema di aspirazione per liquidi (le vaschette #WBPP-08 da noi fornite possono essere svuotate semplicemente capovolgendole).
- Provette e materiale per il prelievo dei campioni, cilindri graduati, contenitori adatti. Pipette automatiche, micropipette e punte usa e getta (10 μ l, 25 μ l, 1,2 ml e 2 ml di volume).
- Acqua distillata o deionizzata. Carta assorbente (es. carta da filtro Whatman), nastro adesivo trasparente.
- Guanti in lattice, pinzette per maneggiare le strisce, cutter o bisturi, righello piatto trasparente.

Nota: I nostri reagenti possono essere utilizzati in un preparatore immunoblot automatico. **Prestare attenzione alle possibili contaminazioni chimiche dei nostri reagenti se il preparatore viene anche usato con reagenti di altro produttore** (per es. è nota la contaminazione da TWEEN 20), e alle contaminazioni batteriche. Tenere scorte di fiale per il preparatore. Dopo l'uso, non riporre i residui di reagente nelle fiale originali.

Conservazione e stabilità

Conservare tra 2 e 8 °C. I reagenti contenuti nel kit sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla scatola esterna e sulle etichette delle fiale. Il buffer di detergente diluito a 1/10 è stabile per due mesi a temperature comprese fra +2 e +8 °C e per una settimana a temperatura ambiente.

Precauzioni d'uso

Sicurezza

- Solamente per uso *in vitro*. Maneggiare secondo le Buone pratiche di laboratorio (BPL) e considerare ogni reagente e ogni campione come potenzialmente tossici e/o infettivi.
- Indossare il camice, guanti e occhiali da laboratorio; non bere, mangiare o fumare all'interno del laboratorio. Non mettere in bocca le pipette.
- Il substrato contiene una miscela di NBT e BCIP, tossica al tatto (per pelle e mucose) e per inalazione.
- I reagenti contengono sodio azide, che può generare sali metallici esplosivi a contatto con piombo e rame. Sciacquare ogni residuo con acqua.
- Smaltire i materiali di scarto (campionature, beccucci, provette, liquido detergente, reagente usato...) secondo le buone pratiche previste dal settore e dalle normative nazionali attualmente in vigore.

Precauzioni

- Non utilizzare insieme reagenti provenienti da lotti diversi.
- Usare le strisce in ordine numerico. Non mescolare strisce provenienti da lotti con numeri di serie diversi; usare le etichette in sequenza progressiva. Programmare un piano di distribuzione specifico prima di iniziare il test.
- Non toccare le strisce con le dita; usare le pinzette.
- I reagenti devono essere miscelati bene prima dell'uso, soprattutto il buffer di detergente concentrato.
- Chiudere le fiale dopo l'uso; non usare i reagenti se accidentalmente contaminati da un'altra sostanza. Non usare il reagente contenuto in una fiala che presenta segni di perdite. Non usare la soluzione se appare torbida o sedimentata.
- Per le pipette usare solamente punte usa e getta. Evitare qualunque contaminazione tra i vari canali. **Verificare l'eventuale formazione di schiuma o bolle all'interno delle punte delle pipette (contaminazione batterica delle fiale di reagente).**

- **I vassoi di incubazione devono essere lavati solamente con acqua pulita seguita da acqua distillata (non usare mai detersivi o candeggianti).**
- L'omissione di un campione o la distribuzione di volume inadeguato può rendere negativo il risultato del test, indipendentemente dalle condizioni specifiche.

Raccolta dei campioni

Raccogliere i campioni in modo asettico all'interno di provette asciutte. La quantità minima richiesta è di 35 µl di siero o 10µl di umor acqueo. Nel caso di umor acqueo, usare 25 µl aumenta la sensibilità del test.

Conservare i campioni a temperatura di 2-8 °C fino al momento dell'utilizzo. Nel caso sia necessaria la refrigerazione, congelare i campioni a temperatura di -20 ± 5 °C. Non utilizzare i campioni contaminati. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio: Per 4 test: in una bottiglia pulita, diluire 10 ml di detergente concentrato 10X (R6) in 90 ml di acqua distillata o deionizzata.

Come si esegue il test

N.B.: Si raccomanda di seguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

1. Preparare attentamente il piano di distribuzione dei campioni.
È assolutamente obbligatorio eseguire il confronto di un paio di campioni con strisce congiunte (numeri contigui) di un'unica confezione di strisce (stesso numero di serie). Non è affidabile effettuare il confronto di strisce molto distanziate tra loro (es. la striscia n. 2 con la n. 15). È pericoloso (falsi risultati) effettuare il confronto di strisce provenienti da confezioni diverse (strisce con numeri di serie diversi).
2. Tagliare il numero richiesto di strisce (R1) con un bisturi e un righello trasparente piatto, pulito e asciutto, tenendo la riga blu di posizionamento sulle strisce: tenere ben ferme le strisce con il righello e tagliarle lungo il lato in.
3. Distribuire 1,2 ml di tampone di diluizione (R2) in ciascun canale secondo il piano di distribuzione stabilito.
4. Depositare, in sequenza, le strisce numerate all'interno dei canali. Far reidratare le strisce per circa 1 minuto, con il numero ben visibile in alto, agitando delicatamente il vassoio e facendole immergere completamente nel buffer.
5. Distribuire i campioni secondo il piano di distribuzione stabilito (punto 1) e i volumi indicati qui avanti:

	Siero	Umor acqueo
IgG	10µl	10 o 25µl
IgM	25µl	-

Nel caso di umor acqueo, usare 25 µl aumenta la sensibilità del test. Agitare delicatamente il vassoio dopo ogni erogazione. Posizionare il vassoio su una piattaforma oscillante. **Mettere in incubazione per 90 min \pm 5 min a 18-25 °C.**

6. Fase di lavaggio: Eliminare il contenuto dai canali usando una pipetta Pasteur o capovolgendo il vassoio di incubazione. Versare da 2 a 3 ml di soluzione di lavaggio in ciascun canale. Mettere in incubazione sulla piattaforma di agitazione per 3 min. Ripetere l'operazione due volte, quindi eliminare il contenuto dai canali. Assicurarsi che le strisce non si capovolgano durante questi passaggi.
7. Distribuire secondo il piano di distribuzione stabilito 1,2 ml di coniugato anti-IgG (R3) o 1,2 ml di coniugato anti-IgM (R4) in ciascun dei pozzetti corrispondenti. Posizionare il vassoio sulla piattaforma oscillante.
Tenere in incubazione per 60 min \pm 5 min a 18-25 °C.
8. Fase di lavaggio: ripetere la fase 6.
9. Distribuire 1,2 ml di substrato NBT/BCIP (R5) in ciascun canale. Posizionare sulla piattaforma oscillante proteggendo dalla luce diretta. **Tenere in incubazione per 60 min \pm 5 min a 18-25 °C.**

Indipendentemente dal parametro, tenere sotto controllo lo sviluppo del colore. Il processo può essere interrotto se il colore di fondo della striscia si scurisce rendendo difficoltosa la lettura (la qualità delle fasi di lavaggio influisce fortemente sulla colorazione di fondo). **Ricordare che asciugando le strisce schiariscono.**

- È essenziale fermare contemporaneamente la rivelazione di 2 strisce della stessa coppia per una stessa sottoclasse di anticorpi ma è possibile interrompere indipendentemente quella di IgG o IgM (IgM, in concentrazioni più basse, si rivelano solitamente più lentamente rispetto agli IgG).
- Il siero del bambino è generalmente meno carico di IgM. Sarà necessario lasciare il tempo affinché la reazione si riveli correttamente, senza aver paura di vedere la striscia materna degli IgM che si oscura un po' di più.
- L'umore acqueo è solitamente meno carico di anticorpi. Sarà necessario lasciare il tempo affinché la reazione si riveli correttamente, senza aver paura di vedere le strisce sieriche che si oscurano un po' di più.

10. Interrompere la reazione aspirando il substrato con una pipetta di Pasteur o capovolgendo la vasca di incubazione e versando 2 ml di acqua distillata nei canali. Ripetere quest'ultimo passaggio di lavaggio ancora una volta.
11. Asciugatura delle strisce: Con i canali ancora pieni di acqua, prendere le strisce dal lato numerato con le pinzette e depositarle, con il numero visibile, su carta da filtro Whatman. Fare asciugare all'aria. Il colore delle strisce si schiarisce naturalmente durante l'asciugatura. L'interpretazione deve essere eseguita dopo la completa asciugatura.
12. posizionamento per la lettura: Trasferire le strisce su un foglio di carta, che servirà per archivarle.

- Appaiare una con l'altra le strisce IgG e IgM di ogni coppia di campioni in ordine numerico crescente, in base al piano di distribuzione stabilito (punto 1).
- Posizionare le strisce con precisione, utilizzando il tratto di posizionamento.
- Tenerle 2 a 2 con la riga graduata piatta e attaccare la parte superiore con del nastro adesivo trasparente.

Non è affidabile effettuare il confronto di strisce molto distanziate tra loro (es. la striscia n. 2 con la n. 15). **È pericoloso** (falsi risultati) effettuare il confronto di strisce provenienti da confezioni diverse (strisce con numeri di serie diversi).

Interpretazione

Descrizione bande:

Un campione positivo può presentare molte bande situate tra 15 e 200 kDa. Soltanto le bande con peso molecolare inferiore a 120 kDa possono essere utilizzate per il confronto dei profili.

1- Interpretazione CIP WB G+M (toxoplasmosi congenita)

- **Alla nascita (coppie madre/bambino):**

Confrontare indipendentemente le strisce IgG e le strisce IgM.

Leggere le 2 strisce contigue contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nel sangue del cordone e **assente** nel siero materno.

Ogni banda con risoluzione ben definita, peso molecolare (PM) inferiore a 120 kDa e *presente solo nel bambino*, dimostra la sintesi da parte del bambino di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi congenita.

- **Durante il follow-up post-natale (coppie Bambino G0 / Bambino G+N):**

Confrontare indipendentemente le strisce IgG e le strisce IgM.

Leggere le 2 strisce contigue contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nel siero a G+N e **assente** nel sangue del cordone.

Ogni banda con risoluzione ben definita, PM < 120 kDa e *presente solo a G+N*, dimostra la sintesi da parte del bambino di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi congenita.

Nota Bene: l'indicazione di CIP-WB IgG / IgM nel follow post-natale è volutamente limitata a 3 mesi nel test IgG e a 1 mese nell'IgM.

Osservazioni: La giustapposizione degli standard dei pesi molecolari colorati (busta R1) permette di stimare il PM delle bande antigeniche rivelate (occorre prima tagliarla con un righello e un bisturi come con una striscia di normale, manipolando con una pinzetta).

A - CIP NEGATIVO
(bambino non infetto)

B - CIP POSITIVO
(bambino infetto)

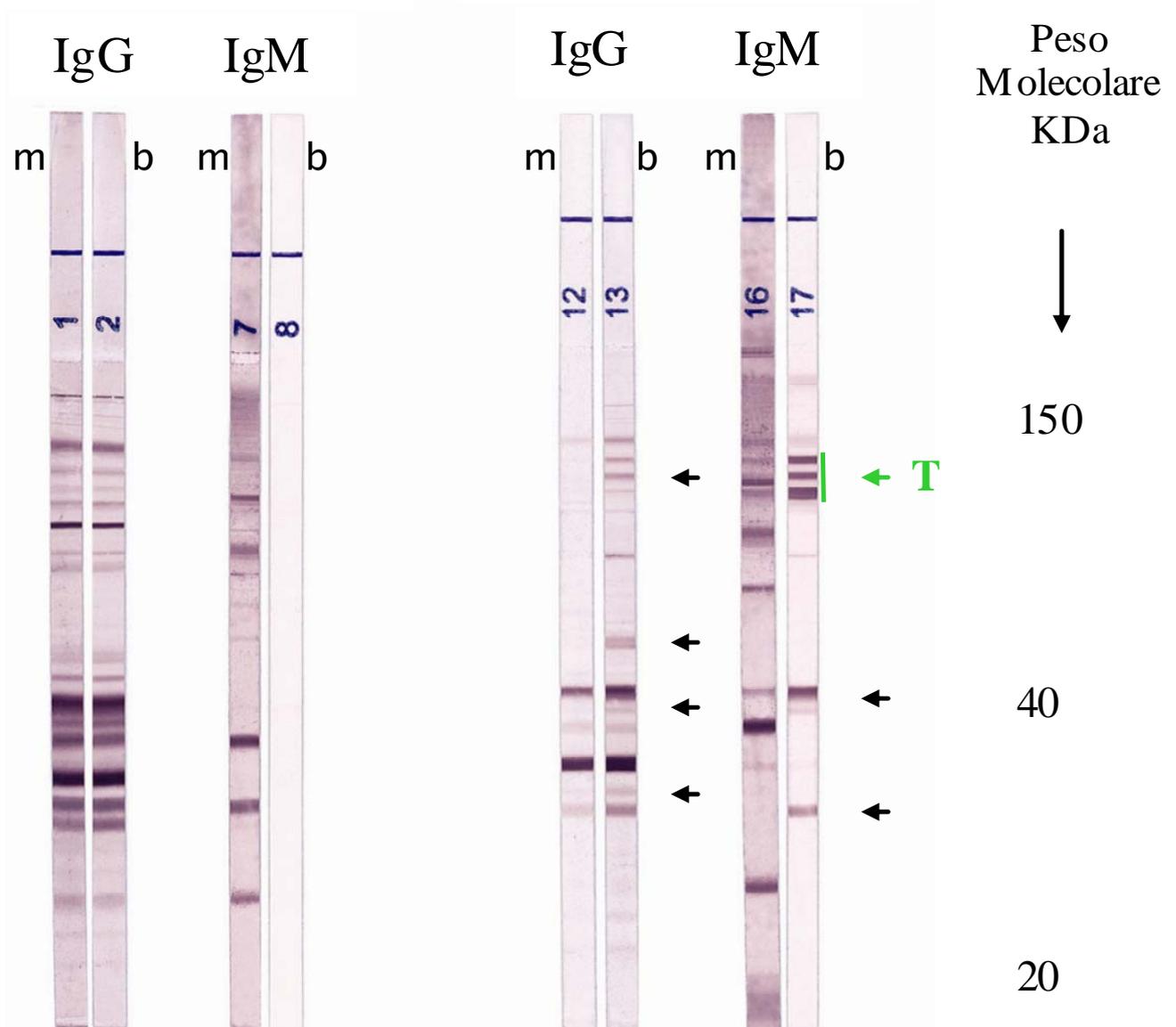


Fig. 1: toxoplasmosi congenita - Esempi di risultato positivo e negativo

La coppia madre-bambino (A) corrisponde a una madre infetta durante la gravidanza, ma il cui bambino è indenne: I profili IgG sono strettamente identici (IgG trasmessi); non ci sono ulteriori bande presenti sulle strisce IgG e/o IgM del bambino: **IL CIP-WB È NEGATIVO.**

La coppia (B) toxoplasmosi congenita, corrisponde ad una madre infetta durante la gravidanza, il cui figlio è stato egualmente infettato. In aggiunta agli anticorpi trasmessi, notiamo perfettamente sulle strisce del bambino la presenza di bande supplementari (↔), in IgG e/o in IgM, corrispondenti agli anticorpi neo-sintetizzati dal bambino: **IL CIP-WB È POSITIVO.**

2- Interpretazione CIP WB IgG (toxoplasmosi oculare)

Leggere le 2 strisce contigue contemporaneamente dall'alto al basso, osservando qualsiasi banda antigenica **presente** nell'umore acqueo **e assente** nel siero.

Ogni banda con risoluzione ben definita, peso molecolare (PM) inferiore a 120 kDa e *presente solo nell'umore acqueo*, dimostra la sintesi locale di anticorpi anti-toxoplasma a favore di una toxoplasmosi oculare.

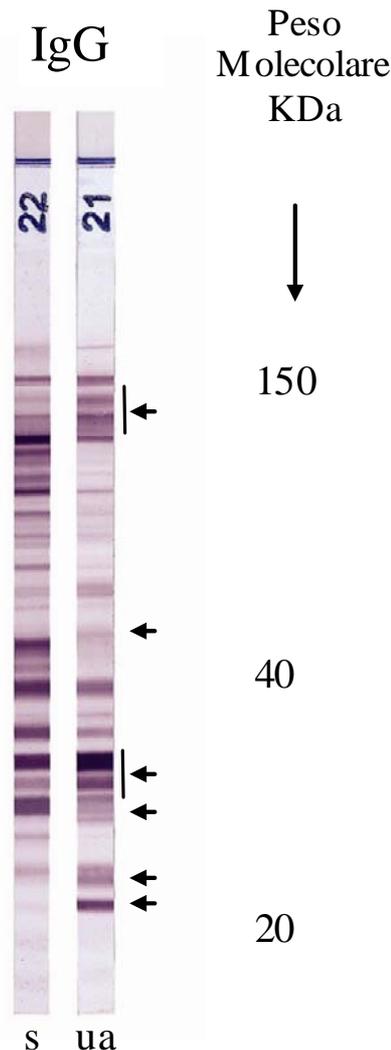


Fig. 2: toxoplasmosi oculare - Esempi di risultato positivo

3- Osservazioni molto importanti

1. I risultati del CIP-WB IgG/IgM devono essere interpretati alla luce di altre informazioni cliniche, sierologiche, parassitologiche, epidemiologiche, imaging medicale, per stabilire la diagnosi della toxoplasmosi congenita o oculare.
2. Un risultato CIP-WB IgG/IgM negativo non esclude la diagnosi di toxoplasmosi congenita o oculare. Questi pazienti devono necessariamente essere seguiti nel tempo fino a quando la diagnosi di toxoplasmosi può essere confermata definitivamente o respinta.

3. Le fasce possono un aspetto molto variabile: sottili, spesse, più o meno colorate, intense...
 Nel destreggiare questa tecnica si raccomanda di fare qualche confronto sui profili di coppie di campioni noti per prendere confidenza con la loro lettura.
 Si raccomanda inoltre che la lettura del CIP-WB venga all'inizio eseguita in modo indipendente da due persone in laboratorio. In caso di discrepanza di interpretazione dovrà essere eseguito un CIP-WB di controllo.
4. Le frazioni antigeniche di altissimo peso molecolare (PM) sono molto ristrette sulla parte alta della striscia in favore di una migliore risoluzione di frazioni di PM medio e basso. Le bande con PM > 120KD non possono pertanto essere utilizzate per l'interpretazione della prova: i campioni che presentano soltanto tali profili differenti non possono essere resi positivi.
5. Per contro (toxoplasmosi congenita), un "tripletta" (tre fasce facilmente riconoscibili) compreso tra 75 e 100 kDa si trova spesso sui positivi CIP WB IgM (vedi "T" Fig. 1 striscia n. 17 a destra).
6. Alla nascita (toxoplasmosi congenita), si dovrebbe diffidare in particolare di ogni rafforzamento generale di intensità delle bande (emoconcentrazione) in quanto potrebbe far credere alla presenza di bande addizionali nel sangue del cordone ombelicale. I sieri che presentano unicamente tali differenze di profilo sono resi negativi.
7. Per contro (toxoplasmosi congenita, toxoplasmosi oculare) il rafforzamento significativo (spesso in larghezza e intensità) di uno o due bande isolate mentre tutte le altre bande hanno intensità identica o minore, viene considerato come criterio di positività.
8. Anticorpi naturali (toxoplasmosi congenita):
 La tecnica di immunoblotting è estremamente sensibile e l'antigene utilizzato per il test CIP-WB è stato selezionato per la molteplicità di bande antigeniche presenti sulla striscia.
 Molte pubblicazioni si riferiscono a bande rivelate da immunoblotting in persone che apparentemente non hanno mai contratto la toxoplasmosi. Questi anticorpi (IgG e IgM) sono raramente rilevati da altre tecniche, ma lo sono molto frequentemente da immunoblotting. Sarebbero dovuti a reazioni incrociate con anticorpi diretti contro gli immunogeni di natura ancora indeterminata. [15, 16, 18]
 Questo è il motivo per cui l'indicazione del test TOXOPLASMA WB IgG-IgM è riservata al confronto dei profili. (Per la conferma delle sierologie IgG, utilizzare solo il test LDBIO TOXO II IgG che è specifico e progettato per questo scopo)
 I neonati non hanno anticorpi naturali (diversi dagli anticorpi materni trasmessi), ma la probabilità di comparsa di anticorpi naturali aumenta con l'età del lattante dopo 3 mesi; si trovano solo raramente tra 3 e 6 mesi. [15]
 Questo è il motivo per cui l'indicazione del test CIP-WB IgG/IgM nel follow-up post-natale è volutamente limitata a 3 mesi in IgG e a 1 mese in IgM: la presenza di bande non specifiche è infatti più precoce in IgM.
9. "Heat shock protein" (toxoplasmosi congenita):
 Una striscia sottile non specifica, di intensità debole ma variabile, può essere presente in IgM all'altezza di 37kDa. Si tratta di un artefatto legato alla preparazione dell'antigene e chiamato "heat shock protein". Presente a volte sia sulle due strisce della coppia madre-figlio, può tuttavia comparire più pronunciato con alcuni sieri nel follow-up del bambino. Non tenere conto di questa banda.
10. CIP-WB (toxoplasmosi oculare): Il CIP-WB IgM non presenta alcuna utilità nella diagnosi della toxoplasmosi oculare.

Prestazioni

❖ Specificità - Sensibilità:

Questi studi sono stati condotti da laboratori di riferimento indipendenti

1/ CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSI CONGENITA alla nascita (Madre/Bambino)

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DATI	TC POS n = 54	41	13
CLINICI	TC NEG n = 60	0	60

Tabella. 1: Prestazioni di CIP-WB IgG/IgM alla nascita (n = 114):

- Specificità = 100%
- Sensibilità = 76%
- Valore predittivo positivo = 100%
- Valore predittivo negativo = 83%

2/ CIP-WB G+M: TOXOPLASMOSI CONGENITA follow-up post-natale (Bambini G0/G20)

Tra i 54 bambini precedentemente testati al G0 (*fig.1*), 10 bambini sani e 12 bambini infettati (n = 22) sono stati monitorati e analizzati al G20 in modo retrospettivo con il test TOXOPLASMA WB IgG-IgM.

A G0: 4 bambini tra i 12 bambini infetti non hanno mostrato un profilo diverso alla nascita (falsi negativi).

A G20: Solo 1 rimane negativo.

		TOXOPLASMA WB IgG-IgM	
		POS	NEG
DATI	TC POS n = 12	11	1
CLINICI	TC NEG n = 10	0	10

Tabella 2: performance di CIP-WB IgG/IgM a G20 (n = 22):

- Specificità = 100%
- Sensibilità = 92%
- Valore predittivo positivo = 100%
- Valore predittivo negativo = 91%

3/ CIP-WB IgG: TOXOPLASMOSI OCULARE (siero/umore acqueo)

I risultati illustrati in basso provengono dalla meta-analisi di quattro studi pubblicati dai centri di riferimento [1; 13; 16; 19].

Questi studi confrontano i risultati di CIP-WB IgG a quelli del coefficiente di Goldmann Witmer (GWC) e a quelli della PCR. Essi illustrano anche i risultati diagnostici ottenuti dall'associazione combinata di due o tre di queste tecniche.

Questi quattro studi si sono serviti tutti del test di LDBIO, seguendo le raccomandazioni contenute nelle istruzioni per l'uso del kit.

La sensibilità è stata stabilita su 113 pazienti che presentavano toxoplasmosi oculare clinicamente provata. La specificità è stata calcolata su una popolazione di controllo che presentava una patologia oculare diversa dall'infezione della toxoplasmosi: toxocariasi oculare (n=5), infezione virale (n=10), altre infezioni (n=4), patologie oculari non infettive (n=126) tra cui cataratta (n=42).

✓ Sensibilità (Se):

- La sensibilità complessiva di CIP-WB IgG è del 62,8% (n=113), risultato paragonabile al GWC (Se=61,0%, n=113) e superiore alla PCR (Se=43,5%, n=92, p=0,0028).
- La combinazione di CIP-WB con GWC e PCR migliora la sensibilità della diagnosi:
 - CIP-WB + GWC: Se=78,1% (n=96, p=0,0082)
 - CIP-WB + GWC + PCR: 86,3% (n=95, p=0,0001)

✓ Specificità (Sp):

- La specificità complessiva di CIP-WB IgG è del 92,8% (n=111), risultato paragonabile al GWC (Sp=94,2%, n=139) e inferiore alla PCR (Sp=100%, n=131, p=0,0009).
- La combinazione delle due tecniche CIP-WB IgG + GWC, riduce leggermente la specificità della diagnosi (Sp=91,1%, n=101, p=0,32). La combinazione con PCR non influenza la specificità.

❖ Riproducibilità:

La riproducibilità all'interno delle serie e dei lotti è stata testata. In entrambi i casi, la correlazione esistente tra siero e siero rispetto alle specifiche bande colorate è eccellente.

❖ Interferenze:

Sebbene nessuna particolare reazione incrociata sia stata osservata con il siero emolitico, itterico o lipidico, si raccomanda di interpretare i risultati di tali campioni con cura.

Ricerca e soluzione di eventuali problematiche

“Le bande colorate sono tenui e hanno poco contrasto”: Alcuni sieri con bassa concentrazione di anticorpi possono dare risultati di questo tipo.

“Si vedono zone sfumate, più o meno colorate, appena diffuse”: La striscia non è stata completamente immersa in uno dei reagenti e non è stata incubata correttamente su tutta la lunghezza. Possono anche comparire delle macchie nel punto di appoggio del campione, se il vassoio non è stato ben agitato dopo l'erogazione.

“Il rumore di fondo è notevole e rende la lettura molto difficoltosa”: I lavaggi non sono stati sufficienti oppure l'ultima incubazione è durata troppo. Assicurarsi di seguire le giuste tecniche procedurali, rispettare i tempi di lavaggio e assicurarsi della qualità dell'acqua. Ridurre il tempo dell'ultima incubazione. Eccezionalmente, alcuni sieri reagiscono in modo anomalo. Pertanto, il risultato dell'immunoblot non è utilizzabile.

Questo rumore di fondo anomalo può interessare solamente parte della striscia, rendendo impossibile l'interpretazione di quella sola parte.

“Durante l'ultima fase di sviluppo nella soluzione compare un precipitato”: il substrato potrebbe in parte precipitare (fiocchi neri) nel buffer alla fine dello sviluppo. Questo fenomeno non altera la qualità dello sviluppo che deve proseguire normalmente. L'ultimo lavaggio con acqua distillata elimina le particelle solide eventualmente presenti.

Bibliografia

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. Runday, 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).