

# TOXOPLASMA ICT IgG-IgM

Technique Immuno-chromatographique  
pour usage diagnostic *In Vitro*

CE0459



# TOXO Ab ICT20 : 20 tests

**ENGLISH VERSION PAGE 9**

## NOTICE D'UTILISATION

### Indication du test

TOXOPLASMA ICT IgG-IgM est un test rapide utilisant la technique immuno-chromatographique qui permet la *détection simultanée* des IgG et des IgM anti-*Toxoplasma* dans les sérums humains.

### Principe

TOXOPLASMA ICT IgG-IgM est un test unitaire qualitatif. Il est basé sur le principe du sandwich homogène (réaction immunologique de 2 épitopes identiques avec les deux sites de liaison d'un anticorps bivalent).

A l'intérieur de la cassette, le dispositif est composé de :

- une bandelette de nitrocellulose sur laquelle sont répartis en deux bandes réactives : l'antigène (*Toxoplasma gondii*) de la bande «test » (T) et les gammaglobulines de lapin de la bande « contrôle » (C),
- un support en fibre de verre (pad conjugué) imprégné de particules de latex rouge couplées à l'antigène toxoplasmique (« latex test » = latex T) et des particules de latex bleu couplées à un anti sérum de chèvre anti-IgG de lapin (« latex contrôle » = latex C).

Le test consiste à déposer successivement un échantillon de sérum et une solution éluante (appelée éluant) dans le puits prévu à cet effet. Commence alors la migration concomitante (chromatographie) du sérum et des particules de latex. Cette migration est achevée en 20-30 minutes.

En cas de présence d'anticorps anti *Toxoplasma* (IgG et/ou IgM) dans l'échantillon, un complexe se forme entre les anticorps du patient et le latex T. Ce complexe est capturé par la bande T et se traduit par l'apparition d'une bande colorée en rouge : le test est positif.

La capture directe du latex C par la bande C provoque l'apparition d'une bande colorée en bleu, témoin du bon fonctionnement de la chromatographie ; l'apparition de la bande contrôle bleue est systématique quelque soit le statut sérologique du patient.

Les deux lettres « T » et « C » sont imprimées sur la cassette afin de matérialiser la position de la zone de lecture correspondante.

## Composition du coffret (20 TESTS)

- 20 cassettes prêtes à l'emploi : 2 sachets (scellés + fermeture minigrip®) de 10 tests incluant un dessicant.
- 1 X 2 ml de tampon d'éluion (flacon compte-gouttes)
- 1 notice

## Conditions de stockage et stabilité

- **Conserver les sachets scellés entre 2 et 8°C.** Les cassettes sont stables jusqu'à la date de péremption inscrite sur l'étiquette du sachet. Ne pas congeler. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.
- **La 1<sup>ière</sup> ouverture doit être effectuée après au minimum 15 min** de séjour du sachet à température du laboratoire pour éviter la condensation.
- **Après la 1<sup>ière</sup> ouverture** d'un sachet de 10 tests, le conserver à **température ambiante (18-30 °C)**, soigneusement refermé (fermeture minigrip®), le dessicant à l'intérieur. La péremption des cassettes est de **2 mois après ouverture du sachet.**

## Précautions d'utilisation

### Sécurité

- Pour usage *in vitro* exclusivement. Manipuler selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et considérer tout réactif et tout échantillon comme potentiellement toxique et/ou infectieux.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Tout échantillon sérique doit être considéré comme potentiellement infectieux et manipulé avec les protections d'usage.
- Porter une blouse, des gants et lunettes, ne pas boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ne pas pipeter avec la bouche.
- Éliminer les déchets (prélèvements, pointes, tubes, liquides de lavage, réactifs usagés...) conformément aux bonnes pratiques en usage dans la profession et aux règlements en vigueur dans le Pays.

### Précautions

- Ne pas utiliser un éluant ayant un numéro de lot différent des cassettes.
- Ne pas travailler avec deux lots de cassettes différents dans la même série.
- Refermer les flacons après usage, ne pas utiliser en cas de pénétration accidentelle de substance dans les réactifs. Ne pas utiliser de réactif provenant d'un flacon présentant des signes de fuite. Ne pas utiliser de solution trouble ou précipitée.
- N'utiliser que des cônes de pipette à usage unique. Eviter toute contamination inter-cassette.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.
- L'omission de distribution d'un échantillon ou la distribution d'un volume inapproprié peut faire considérer comme positif ou négatif le résultat du test quel que soit son statut sérologique réel.
- N'utiliser que des cassettes soigneusement conservées dans leur sachet fermé, le dessicant à l'intérieur.

## Prélèvement et préparation des échantillons

Le test utilise indifféremment du sérum ou du plasma.

Le prélèvement sanguin doit être fait de façon aseptique sur tube sec ou tube avec anticoagulant (héparine, citrate ou EDTA).

Sur tube avec gel, ne pas prélever de gel qui peut être responsable de faux positifs.

Eviter autant que possible l'hémolyse du prélèvement.

Maintenir les échantillons à 2-8°C jusqu'à leur mise en oeuvre. S'ils doivent être conservés, les congeler à  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ . Ne pas utiliser d'échantillon contaminé. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois.

## Mode opératoire

Matériel nécessaire mais non fourni : micropipette et embouts à usage unique pour la distribution de 30µL, chronomètre

**Si les sachets de 10 tests sont conservés à 2-8°C, les laisser 15 minutes au minimum à température ambiante** avant de les ouvrir : les températures s'équilibrent pour éviter la condensation.

1. Après avoir sorti le nombre de cassettes désiré, refermer soigneusement le sachet (avec le dessicant à l'intérieur) en chassant au mieux l'air contenu. Conserver le sachet et l'éluant à température ambiante, 2 mois au maximum. L'éluant peut être conservé à température ambiante jusqu'à la date de péremption.
2. **Identifier chaque cassette** à l'aide du numéro de l'échantillon à tester. Ne pas travailler avec des séries de plus de 10 cassettes. Deux séries successives de 10 cassettes doivent être décalées de quelques minutes afin de pouvoir effectuer les lectures aux temps recommandés (utiliser 2 chronomètres).
3. A l'aide d'une micropipette montée d'un embout jetable, déposer 30 µl de sérum ou plasma dans le puits échantillon. Pratiquer de même avec toutes les cassettes à utiliser d'une même série avant de passer à l'étape suivante.
4. Déposer dans le puits **3 gouttes** d'éluant présent dans le coffret. **Ne pas utiliser un éluant ayant un numéro de lot différent.** Tenir le compte-gouttes retourné verticalement pendant la distribution. Reboucher le compte-goutte après usage.
5. Déclencher le chronomètre quand l'éluant est réparti dans les cassettes de la série.

## Lecture et interprétation

Effectuer la lecture près d'une fenêtre à la lumière du jour ou sous éclairage direct (par exemple : une lampe de bureau). Eviter les ombres projetées sur la zone de lecture. La lecture du test doit être faite entre 20 et 30 min après déclenchement du chronomètre. **Ne pas tenir compte des résultats obtenus après 30 min.**

- **Test positif** : 2 lignes, une rouge (T) et une bleue (C), apparaissent dans les zones correspondantes. Toute ligne « T » rouge, même de faible intensité doit être considérée comme positive. Pour lire avec certitude une bande de faible intensité, effectuer la lecture l'œil à la verticale de la zone de lecture.
- **Test équivoque** : l'apparition d'une ombre grisâtre à l'endroit de la bande test, le plus souvent entre 20 et 30 min est à considérer comme un résultat équivoque. La ligne bleue apparaît normalement. L'échantillon est rendu comme négatif.  
Il est souhaitable de contrôler le sérum en cause par une autre technique ou sur un prélèvement ultérieur.
- **Test négatif** : Aucune ligne rouge n'apparaît, seule la ligne bleue « C » apparaît.
- **Test non valide** : La ligne « C » bleue n'apparaît pas. Relire les instructions et renouveler le test. Si le problème persiste, contacter le fabricant ou votre distributeur.

**Remarques** : Le test est qualitatif. L'intensité de la bande rouge ne peut en aucun cas indiquer le taux d'anticorps anti-*Toxoplasma* présent dans l'échantillon.

La vitesse d'apparition de la bande rouge semble cependant corrélée à la quantité d'anticorps présents et pourrait donner une indication non chiffrée sur le taux d'anticorps.

La positivité du test met en évidence le contact du patient avec le toxoplasme et ne préjuge pas de la date de ce contact ou du statut immunitaire du patient.

## Contrôle de qualité

La ligne « C » bleue permet de valider le bon déroulement du test.

Il est néanmoins recommandé d'incorporer de temps en temps dans la série de tests à effectuer un échantillon positif faible connu.

## Limites du test

- Ne pas tester des échantillons sériques trop âgés par cette technique. Il est recommandé de se limiter à des sérums conservés congelés de moins de 2 ans.
- La positivité peut être liée à la présence d'IgG et/ou d'IgM anti toxoplasme, le test fonctionnant sur le principe de l'agglutination.
- L'utilisation d'autres liquides corporels autre que le sérum ou le plasma n'a pas été validée (urine, LCR, salive, sang total...)
- L'utilisation d'échantillons hémolysés, ictériques ou lipidiques n'est pas recommandée ; néanmoins, il n'a pas été noté d'interférence dans la réaction pour des échantillons présentant ce type d'aspect. Toutefois, une hémolyse importante peut masquer la présence éventuelle d'une bande test de faible intensité du fait du bruit de fond rougeâtre lié à l'hémolyse.
- Ne pas déposer 2 ou 4 gouttes d'éluant.
- **Attention** : **L'oubli de dépôt de sérum, avec seulement le dépôt des 3 gouttes d'éluant se traduit par l'apparition de la bande test (réaction positive).**
- **Ne pas utiliser un éluant autre que celui livré avec les cassettes (même numéro de lot).**
- **Les résultats du test Toxoplasma ICT IgG-IgM doivent être interprétés au vu des autres renseignements cliniques, sérologiques, parasitologiques, épidémiologiques, imagerie médicale, afin d'établir le diagnostic de toxoplasmose.**

## Performances

### ❖ Sensibilité, Spécificité

#### 1. Matériel et méthode :

L'évaluation a été réalisée dans un laboratoire de référence, spécialiste du diagnostic de la toxoplasmose et appartenant au réseau du centre national de référence (CNR) de la toxoplasmose.

Le statut sérologique (positif ou négatif) est celui qui a été retenu par le laboratoire à partir des données biologiques et épidémiologiques et après traitement de tous les résultats discordants par techniques de confirmation (LDBIO-TOXO II IgG, ISAGA IgM, test de lyse des toxoplasmes de Sabin et Feldman).

Le principe de l'évaluation a consisté à comparer sur 486 échantillons (dont 67 sangs de cordon) les résultats de la technique LDBIO ICT avec deux de 3 techniques sérologiques commercialisées : ELISA IgG, ELISA IgM et hemagglutination (HAI).

Les résultats ELISA G et ELISA M ont été analysés ensemble (= ELISA G+M) pour une meilleure comparaison du fait de la détection simultanée des IgG et des IgM par l'ICT et l'HAI.

Deux études ont été menées parallèlement :

- ✓ Une étude prospective : sur 356 échantillons issus de l'activité de routine du laboratoire.
- ✓ Une étude rétrospective sur 130 échantillons sélectionnés pour leur profil particulier et répartis en 5 groupes :
  - Groupe 1 - séroconversion : Il s'agit de l'analyse rétrospective de 9 séquences de sérums (30 échantillons) provenant de patientes ayant présenté une séroconversion toxoplasmique pendant leur grossesse.
  - Groupe 2 - suivi d'enfants non infectés : Il s'agit de l'analyse rétrospective de 15 échantillons correspondant à 5 séquences du suivi post-natal d'enfants nés de mères ayant présenté une séroconversion toxoplasmique en cours de grossesse.
  - Groupe 3 - faux positifs ELISA : 4 faux positifs ELISA G, 11 faux positif ELISA M dont 1 faux positif et 6 équivoques ISAGA IgM.
  - Groupe 4 – populations particulières :
    - IgM résiduelles (n=5),
    - IgG taux faibles (n=20) sélectionnés en ELISA G entre 1,1 et 3,3 UI/ml (remarque : sur ces 20 échantillons, 2 sont donc considérés négatifs et 16 équivoques selon les critères de positivité de l'ELISA utilisée),
    - IgG taux forts (n=10),
    - réactivations sérologiques (n=10),
    - sérums issus de prélèvements multi-organes (n=10, 9 positifs, 1 négatif).
  - Groupe 5 – réactions croisées potentielles : sérums négatifs en toxoplasmose mais positifs en recherche d'anticorps anti-EBV et/ou CMV (n=10) ou du facteur rhumatoïde (n=5).

## 2. Résultats :

- ✓ Population totale (étude prospective + rétrospective) : n=486

	ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT		ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT
Positifs	151	175	189	Positifs	16	2	7
Négatifs	9	14	0	Négatifs	276	295	290
Equivoques	29	0	0	Equivoques	5	0	0
Se	94.6%	92.9%	100%	Sp	94.6%	99.3%	97.7%

**Table 1 :** résultats sur l'ensemble de l'étude des différentes techniques par rapport au statut sérologique retenu (n=486). Pour l'ELISA, les résultats équivoques ont été exclus des calculs de sensibilité et spécificité.

- ✓ Etude prospective : n=356

	ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT		ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT
Positifs	88	96	105	Positifs	1	0	6
Négatifs	4	9	0	Négatifs	249	251	245
Equivoques	13	0	0	Equivoques	1	0	0
Se	95.7%	91.4%	100%	Sp	99.6%	100%	97.6%

**Table 2 :** Résultats lors de l'étude prospective des différentes techniques par rapport au statut sérologique retenu (n=356). Pour l'ELISA, les résultats équivoques ont été exclus des calculs de sensibilité et spécificité.

- ✓ Etude rétrospective : n=130

- Groupe 1 – séroconversion :  
Sur les 9 séquences, 1 est détectée plus précocement par LDBIO ICT. Tous les autres résultats sont concordants avec les 3 techniques.
- Groupe 2 – suivi d'enfants non infectés :  
LDBIO ICT a permis de détecter la positivité d'un sérum déjà négatif avec les autres techniques. Tous les autres résultats sont concordants avec les 3 techniques.
- Groupe 3 – faux positifs ELISA (statut sérologique NEGATIF) : n=15

	HAI		ISAGA IgM			LDBIO ICT	
	Pos	Neg	Pos	Eq	Neg	Pos	Neg
Faux positifs ELISA IgG	0	4	NA	NA	NA	0	4
Faux positifs ELISA IgM	2	9	1	6	4	0	11

**Table 3 :** Performances comparées des différentes techniques pour les sérums faux positifs en ELISA.

- Groupe 4 – populations particulières :  
A l'exception des sérums avec un taux faible d'IgG, les résultats sont concordants entre toutes les techniques. Aucun phénomène de prozone, même au taux de 2000 UI/mL, n'a

été observé dans aucune des trois techniques.

Pour les IgG de taux faibles (statut sérologique POSITIF), les résultats sont les suivants :  
n=20

	ELISA G+M			HAI		LDBIO ICT	
	Pos	Equivoque	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
IgG comprises entre 1,1 et 3,3 UI/ml	2	16	2	18	2	20	0

**Table 4** : Performances des différentes techniques pour les échantillons présentant un taux d'IgG faible

- Groupe 5 – réactions croisées potentielles :

Sur les 10 sérums positifs en EBV et/ou CMV, aucun n'a rendu de résultat faussement positif ni en LDBIO ICT ni en HAI. 1 résultat équivoque a été retrouvé en ELISA. Sur les 5 sérums positifs en facteur rhumatoïde, 1 échantillon était faussement positif en LDBIO ICT et équivoque en ELISA mais était bien identifié en HAI.

Il pourrait donc y avoir un risque de réaction croisée avec cette population, mais une étude sur une plus grande population est nécessaire pour pouvoir l'affirmer avec certitude.

### 3. Conclusions :

La corrélation entre le statut sérologique et LDBIO ICT est excellente :

- sensibilité  $Se = 100\%$ ,
- spécificité  $Sp = 97,7\%$ ,
- valeur prédictive négative  $VPN = 100\%$ .

LDBIO ICT présente une limite de détection basse ( $<2UI/ml$ ) sans présenter de résultats équivoques.

L'analyse des 67 sangs de cordons n'a révélé aucun résultat discordant entre le statut sérologique et LDBIO ICT, ce qui permettrait de valider l'utilisation de la technique sur de tels prélèvements.

Un résultat positif en ICT ne permet pas de faire la différence entre IgG, IgM ou la présence simultanée d'IgG et d'IgM.

#### ❖ Reproductibilité :

Reproductibilités inter-séries et inter-lots ont été testées. Dans les deux cas, la corrélation sérum à sérum est excellente.

#### ❖ Interférences :

Bien qu'aucune interférence particulière n'ait été relevée avec des sérums hémolysés, ictériques ou lipidiques, il est conseillé d'interpréter les résultats provenant de l'utilisation de tels échantillons avec prudence.

## Bibliographie

- Franck, Jacqueline, Yves Jean-François Garin, et Henri Dumon. 2008. « LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection ». *Journal of clinical microbiology* 46 (7): 2334-38.  
doi:10.1128/JCM.00182-08.
- Jost, C, F Touafek, A Fekkar, R Courtin, M Ribeiro, D Mazier, et L Paris. 2011. « Utility of immunoblotting for early diagnosis of toxoplasmosis seroconversion in pregnant women ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18 (11): 1908-12.  
doi:10.1128/CVI.05303-11.
- Khammari, Imen, Fatma Saghrouni, Sami Lakhali, Aida Bouratbine, Moncef Ben Said, et Jalel Boukadida. 2014. « A New IgG Immunoblot Kit for Diagnosis of Toxoplasmosis in Pregnant Women ». *The Korean Journal of Parasitology* 52 (5): 493-99.  
doi:10.3347/kjp.2014.52.5.493.
- Khammari, Imen, Fatma Saghrouni, Alia Yaacoub, Sondoss Gaied Meksi, Hinda Ach, Lamia Garma, Akila Fathallah, et Moncef Ben Saïd. 2013. « IgG Western Blot for Confirmatory Diagnosis of Equivocal Cases of Toxoplasmosis by EIA-IgG and Fluorescent Antibody Test ». *The Korean Journal of Parasitology* 51 (4): 485-88.  
doi:10.3347/kjp.2013.51.4.485.
- Leslé, F, F Touafek, A Fekkar, D Mazier, et L Paris. 2011. « Discrepancies between a new highly sensitive *Toxoplasma gondii* ELISA assay and other reagents: interest of Toxo IgG Western blot ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30 (10): 1207-12. doi:10.1007/s10096-011-1214-1.
- Maudry, A., G. Chene, R. Chatelain, B. Bellete, H. Patural, J. Hafid, H. Raberin, R. Tran Manh Sung, et P. Flori. 2009. « Expertise du nouveau test Access® TOXO-IgGII et comparaison avec trois autres techniques automatisées et la technique Western Blot LDBIO TOXO II IgG® ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 24 (1): 42-49.  
doi:10.1016/j.immbio.2008.11.004.
- Maudry, Arnaud, Gautier Chene, Rémi Chatelain, Hugues Patural, Bahrie Bellete, Bernard Tisseur, Jamal Hafid, et al. 2009. « Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 16 (9): 1322-26.  
doi:10.1128/CVI.00128-09.
- Robert-Gangneux, F., et M.-L. Darde. 2012. « Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2): 264-96.  
doi:10.1128/CMR.05013-11.



## TOXOPLASMA ICT IgG-IgM

Immuno-chromatographic test  
for *in vitro* diagnostic use



# TOXO Ab ICT20 : 20 tests

### INSTRUCTION FOR USE

#### Intended use

TOXOPLASMA ICT IgG-IgM is a rapid test based on the immuno-chromatography technology (lateral flow), allowing the *simultaneous detection* of both IgG and IgM class anti-*Toxoplasma* antibodies in human sera.

#### Principle of the test

TOXOPLASMA ICT IgG-IgM is a unitary test for a qualitative diagnostic. It is based on the principle of the homogeneous sandwich (immunological reaction of two same antigen epitopes with the two binding sites of a bivalent antibody).

Inside the cassette, the device is composed of:

- a nitrocellulose strip on which are spread two reactive bands: the antigens (*Toxoplasma gondii*) of the “test” band (T band) and the rabbit gamma globulins of the “control” band (C band),
- a fiberglass support (conjugate pad) which is impregnated of red latex particles coupled with *Toxoplasma* antigens (“test” latex = T latex) and blue latex particles coupled with goat anti-rabbit IgG (“control” latex = C latex).

The test is run by successively dispensing the serum sample and an eluting solution (called the eluent) in the “sample well” of the cassette. Adding the eluent starts the concomitant migration (chromatography) of the serum and the latex particles. This migration is completed in 20-30 minutes.

If anti-*Toxoplasma* antibodies (IgG and/or IgM) are present in the sample, a complex is formed between the T latex and the patient’s antibodies which is then captured by the T band. It results in the appearance of a red line: the test is positive.

The direct capture of the C latex by the C band results in the appearance of a blue line, meaning that the chromatography performed well. The appearance of this blue line is systematic and independent of the serological status of the patient.

Both letters “T” and “C” are printed on the plastic frame of the cassette, materializing the position of the corresponding reading area.

## Kit components (20 TESTS)

- 20 ready to use tests: 2 bags (sealed + zip closure) of 10 devices including a desiccant packet,
- 1 x 1.4 ml of the eluent (dropper bottle),
- 1 instruction for use manual.

## Storage and stability

- **Store the original sealed bag between 2 and 8°C.** Cassettes can be used until the expiry date written on the bag label. Do not freeze. Do not use after the expiry date.
- **The first opening of a bag of 10 tests must occur at least 15 minutes after** putting the bag at room temperature in order to avoid condensation.
- **After the first opening** of a bag, keep it **at room temperature (18-30°C)**, carefully closed (zip closure), the desiccant packet inside. After opening, the cassettes can be used **for up to 2 month.**

## Precautions for use

### Safety

- For *in vitro* use only. Handle according to Good Laboratory Practices and consider any reagent and any sample as potentially toxic and/or infectious.
- For professional use only.
- All serum samples must be considered as potentially infectious and handled with care.
- Wear a lab coat, gloves and glasses; do not drink, eat or smoke in the laboratory. Do not mouth the pipettes.
- Dispose of waste (samples, tips, tubes, cassettes, used reagent...) according to good practices used in the industry and current regulations in the country.

### Precautions

- Do not use eluent from another lot number.
- Do not use cassettes from two different lot numbers in the same run.
- Close the vials after use; do not use if a substance was accidentally introduced in the reagents. Do not use reagent from a vial that presents signs of leakage. Do not use cloudy or precipitated solution.
- Use only disposable pipette tips. Avoid any inter-cassette contamination.
- Do not use reagents after their expiration date.
- The omission of a sample or the distribution of an inadequate volume may render the test result positive or negative, regardless of its actual serological status.
- Only use cassettes carefully stored in their closed bag, the desiccant packet inside.

## Serum collection and preparation

The test can be done with either serum or heparinised plasma.

Sample collection must be sterile and can be done either on dry tube or with heparin, citrate or EDTA.

On tubes with gel, do not collect gel: it could lead to false positives.

Avoid hemolysis as much as possible.

Keep the samples at 2-8 °C until they are processed. If they need to be stored, freeze the samples at  $-20 \pm 5$  °C. Do not use a contaminated sample. Avoid freezing and thawing the samples repeatedly.

## Test procedure

Additional material required: micropipette and disposable tips for dispensing volumes of 30µL, timer.

**If the bags of 10 tests are kept at 2-8°C, let them at least 15 minutes at room temperature** before opening: the temperature of the bag must reach the room temperature to avoid condensation.

1. Take out the desired number of cassettes, then close carefully the bag with the zip closure (the desiccant packet inside) while pressing out as much air as possible. **Store the bag at room temperature for up to 2 months.** The eluent can be stored at room temperature until expiration date.
2. **Identify each cassette** with the reference of each sample to be tested. Do not work with runs of more than 10 cassettes. Two successive runs of 10 cassettes must be separated with a few minutes in order to be able to make the reading at recommended times (use 2 timers).
3. Use a micropipette with a disposable tip to dispense 30µL of serum or plasma in the sample well. Do so for all cassettes before moving to the next step.
4. Dispense **3 drops** of the eluent of the kit. **Do not use the eluent of another lot number.** Keep the dropper vertically while dispensing. Close the dropper after use.
5. Start the timer when the eluent is dispensed in all the cassette of the run.

## Reading and interpretation

The reading must be done near a window or under direct light (i.e. a desk lamp). Avoid shadows on the reading area.

The reading must be done between 20 and 30 minutes after starting the timer.

***Do not take into account the results from readings after 30 minutes.***

- **Positive test:** 2 lines, a red “T” and a blue “C” appear in the corresponding areas. Every “T” line must be considered positive, even of very weak intensity. For very weak lines, make the reading with the eye vertically above the reading area.
- **Equivocal test:** The apparition of a grey shadow in the test area, most often between 20 and 30 minutes, is an equivocal result. The blue line must appear normally. The sample is considered negative. In this case, however, it is better to control the result with another technique or on a further sample.
- **Negative test:** No red line appears. Only the blue “C” line is visible.
- **Invalid test:** The “C” line does not appear. Read once again the instruction and repeat the test. If the problem persists, contact the manufacturer or your distributor.

**Notes:** This is a qualitative test. Intensity of the red line does not reflect the quantity of anti-*Toxoplasma* antibodies in the sample.

However, the rate of appearance of the red line seems correlated to the quantity of antibodies and could give an idea of the antibody titer.

Positivity of the test is proof of the contact of the patient with *Toxoplasma* but doesn't prejudge the contact date or the clinical status of the patient.

## Quality control

The blue “C” line allows the validation of the good running of the test. However it is recommended to incorporate from times to times a known weak positive sample in a run.

## Test limitations

- Do not use too old serum sample with this technique. It is recommended to use samples frozen for less than 2 years.
- The positivity can be caused by the presence of IgG and/or IgM anti *Toxoplasma*, the test being based on agglutination principle.
- The use of other body fluids (urine, CSF, saliva, whole blood...) has not been validated.
- The use of hemolytic, icteric or lipidic samples is not recommended. However, no interference in the reaction was recorded. Still, very hemolytic samples can hide a weak positive test, due to important red background from hemolysis.
- Do not dispense 2 or 4 drops of eluent.
- **Warning:** Forgetting to dispense the sample, and only use the three drops of eluent will lead to false positive results.
- Do not use eluent outside the one given with the cassettes (same lot number).
- **The Toxoplasma ICT IgG-IgM results must be interpreted in light of other clinical, serological, parasitological, epidemiological and medical imaging information in order to establish the diagnosis of toxoplasmosis.**

## Performances

### ❖ Sensitivity, Specificity:

#### 1. Material et methods:

The evaluation was done in a Reference Laboratory specialising in the diagnosis of toxoplasmosis and member of the French national reference centres network (CNR) for toxoplasmosis.

The serological status (positive or negative) was the final result of the routine diagnostic in the laboratory from the patient's biological and epidemiological data. The discordant biological results were solved by the use of confirmatory techniques LDBIO-TOXO II IgG, ISAGA IgM and Sabin and Feldman's DYE TEST).

The principle of the evaluation consisted of comparing the results of 486 samples (including 67 cord blood samples) obtained with the LDBIO ICT and the results obtained with 3 commercial serological tests (ELISA IgG, ELISA IgM and Indirect Hemagglutination Assay - IHA).

The results of ELISA IgG and ELISA IgM were compiled (ELISA G+M) in order to have a better comparison as both LDBIO ICT and IHA detect simultaneously IgG and IgM class antibodies.

Two studies were conducted in parallel:

- ✓ A prospective study on 356 samples from the routine activity of the laboratory.
- ✓ A retrospective study on 130 samples selected for their specific profile and spread into 5 groups:
  - Group 1 – seroconversion: retrospective analysis of 9 serum sequence (30 samples) from patients having presented a toxoplasmosis seroconversion during their pregnancy.
  - Group 2 – monitoring of uninfected children: This is a retrospective analysis of 15 samples corresponding to 5 sequences of post-natal monitoring of children born to mothers who presented a toxoplasmosis seroconversion during pregnancy.
  - Group 3 – false positive with ELISA: 4 false positive with ELISA IgG and 11 false positive ELISA IgM including 1 false positive and 6 equivocal results by ISAGA IgM.
  - Group 4 – particular populations :
    - residual IgM (n=5),
    - weak IgG level (n=20), selected in ELISA IgG with antibodies level between 1.1 and 3.3 UI/mL (note : of these 20 samples, 2 were therefore considered negative and 16 equivocal according to the criteria of the ELISA used in the study)
    - strong IgG level (n=10),
    - serological reactivation (n=10),
    - sera from multi-organ transplant donor (n=10, 9 positives, 1 negative).
  - Group 5 – potential cross reactions: sera negative for toxoplasmosis but with anti-CMV and/or anti-EBV (n=10) and sera with rheumatoid factor (RF, n=5).

## 2. Results:

- ✓ Whole population (prospective + retrospective studies): n=486

	ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT		ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT
Positive	151	175	189	Positive	16	2	7
Negative	9	14	0	Negative	276	295	290
Equivocal	29	0	0	Equivocal	5	0	0
Se	94.6%	92.9%	100%	Sp	94.6%	99.3%	97.7%

**Table 5:** results of the different techniques compared to the serological status (n=486) for the entire study. Equivocal results in ELISA were excluded from sensitivity and specificity calculations.

- ✓ Prospective study: n=356

	ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT		ELISA G+M	HAI	LDBIO ICT
Positive	88	96	105	Positive	1	0	6
Negative	4	9	0	Negative	249	251	245
Equivocal	13	0	0	Equivocal	1	0	0
Se	95.7%	91.4%	100%	Sp	99.6%	100%	97.6%

**Table 6:** results of the different techniques compared to the serological status (n=486) for the prospective study. Equivocal results in ELISA were excluded from sensitivity and specificity calculations.

- ✓ Retrospective study n=130

- Group 1 - seroconversion:  
Of the 9 sequences, 1 is detected earlier by the LDBIO ICT. All other results were concordant for all three techniques.
- Group 2 – monitoring of uninfected children:  
LDBIO ICT allowed the detection of a serological positivity on a serum already negative with the two other techniques. All other results were concordant for all three techniques.
- Group 3 – false positive ELISA (NEGATIVE serological status) n=15:

	IHA		ISAGA IgM			LDBIO ICT	
	Pos	Neg	Pos	Eq	Neg	Pos	Neg
false positive ELISA IgG	0	4	NA	NA	NA	0	4
false positive ELISA IgM	2	9	1	6	4	0	11

**Table 7:** Compared performances of the different techniques for the false positive serum in ELISA

- Group 4 – particular populations:

With the exception of the weak IgG level samples, the results were concordant between all the techniques. No prozone effect was observed in any of the three techniques, even with 2000UI/mL IgG level.

For the weak IgG level (POSITIVE serological status), the results are as follow: n=20

	ELISA G+M			IHA		LDBIO ICT	
	Pos	Equivocal	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
IgG between 1,1 et 3,3 UI/ml	2	16	2	18	2	20	0

**Table 8:** Performances of the different techniques for the weak IgG level group

- Group 5 – potential cross reactions:

Of the 10 sera positive for EBV and/or CMV, none were found positive with ICT and IHA, but one was found equivocal with ELISA. Of the 5 sera positive for rheumatoid factor, one was falsy positive in ICT and equivocal in ELISA but correctly identified by IHA. All others samples were correctly identified.

There may be a potential cross reaction with this population, but a study on a greater number of serums is needed in order to conclude.

### 3. Conclusions :

Correlation between the serological status and LDBIO ICT is excellent:

- sensibility Se=100%,
- specificity Sp=97,7%,
- predictive negative value PNV = 100%.

LDBIO ICT has a low detection limit (<2UI/mL) without equivocal results.

The analysis of the 67 cord blood samples did not gave any discordant results between ICT and the conclusion, showing that LDBIO ICT could be use on such samples.

A positive result in LDBIO ICT cannot discriminate between IgM, IgG or the simultaneous presence of IgG and IgM.

#### ❖ Reproducibility:

Inter-series and inter-lot reproducibility were tested. In both cases, the serum to serum correlation is excellent.

#### ❖ Interferences:

Even though no particular cross-reaction has been observed with haemolysed, icteric or lipidic sera, it is recommended to interpret the results from the use of such samples with care.

## Bibliographie

- Franck, Jacqueline, Yves Jean-François Garin, et Henri Dumon. 2008. « LDBio-Toxo II immunoglobulin G Western blot confirmatory test for anti-toxoplasma antibody detection ». *Journal of clinical microbiology* 46 (7): 2334-38.  
doi:10.1128/JCM.00182-08.
- Jost, C, F Touafek, A Fekkar, R Courtin, M Ribeiro, D Mazier, et L Paris. 2011. « Utility of immunoblotting for early diagnosis of toxoplasmosis seroconversion in pregnant women ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 18 (11): 1908-12.  
doi:10.1128/CVI.05303-11.
- Khammari, Imen, Fatma Saghrouni, Sami Lakhall, Aida Bouratbine, Moncef Ben Said, et Jalel Boukadida. 2014. « A New IgG Immunoblot Kit for Diagnosis of Toxoplasmosis in Pregnant Women ». *The Korean Journal of Parasitology* 52 (5): 493-99.  
doi:10.3347/kjp.2014.52.5.493.
- Khammari, Imen, Fatma Saghrouni, Alia Yaacoub, Sondoss Gaied Meksi, Hinda Ach, Lamia Garma, Akila Fathallah, et Moncef Ben Saïd. 2013. « IgG Western Blot for Confirmatory Diagnosis of Equivocal Cases of Toxoplasmosis by EIA-IgG and Fluorescent Antibody Test ». *The Korean Journal of Parasitology* 51 (4): 485-88.  
doi:10.3347/kjp.2013.51.4.485.
- Leslé, F, F Touafek, A Fekkar, D Mazier, et L Paris. 2011. « Discrepancies between a new highly sensitive *Toxoplasma gondii* ELISA assay and other reagents: interest of Toxo IgG Western blot ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 30 (10): 1207-12. doi:10.1007/s10096-011-1214-1.
- Maudry, A., G. Chene, R. Chatelain, B. Bellete, H. Patural, J. Hafid, H. Raberin, R. Tran Manh Sung, et P. Flori. 2009. « Expertise du nouveau test Access® TOXO-IgGII et comparaison avec trois autres techniques automatisées et la technique Western Blot LDBIO TOXO II IgG® ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 24 (1): 42-49.  
doi:10.1016/j.immbio.2008.11.004.
- Maudry, Arnaud, Gautier Chene, Rémi Chatelain, Hugues Patural, Bahrie Bellete, Bernard Tisseur, Jamal Hafid, et al. 2009. « Bicentric evaluation of six anti-toxoplasma immunoglobulin G (IgG) automated immunoassays and comparison to the Toxo II IgG Western blot ». *Clinical and vaccine immunology: CVI* 16 (9): 1322-26.  
doi:10.1128/CVI.00128-09.
- Robert-Gangneux, F., et M.-L. Darde. 2012. « Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2): 264-96.  
doi:10.1128/CMR.05013-11.



NF EN ISO 13485 - ISO 9001

19A rue Louis Loucheur - 69009 LYON - FRANCE  
 TEL : +33(0)4 7883 3487 - FAX : +33(0)4 7883 3430  
 www.ldbiodiagnostics.com - email : contact@ldbiodiagnostics.com