

TOXOCARA **CE**



Western Blot IgG

In vitro Diagnostik Immunoblot
Assay Halbautomatische / manuelle Technik

#TXA-WB24G: 24 tests

#TXA-WB12G: 12 tests

#TXA-WB96G: 96 tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Weitere Informationen und die Gebrauchsanweisung in Ihrer Sprache finden Sie
auf unserer Website www.ldbiodiagnostics.com

Verwendungszweck

TOXOCARA Western Blot (WB) IgG ist ein Einwegtest für den qualitativer serologischen IgG-Diagnose mittels Immunoblot-Assay auf Toxocariasis, der als Bestätigungstest bei einem positiven oder mehrdeutigen Ergebnis in klassischen Screeningtests vorgesehen ist. Er kann mit Sera, Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder Kammerwasser durchgeführt werden.

Testprinzip

Western Blot-Technik

Die exkretorischen/sekretorischen (ES) -Antigene von *Toxocara canis* 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

Jede zu prüfende Serumprobe (oder CSF/Kammerflüssigkeit) wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Toxocara*-Antikörper binden selektiv an die ES-Antigene von *T. canis*. Das alkalische Phosphatase Anti-Human-IgG-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Toxocara*-Antikörper. Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Toxocara*-Antikörpern erkannten Antigene vom Typ IgG werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

Im Kit enthaltene Reagenzien

Standard: Packung mit 24 Tests (#TXA-WB24GM)

kursiv: Packung mit 12 Tests (#TXA-WB12G) - **fett**: Packung mit 96 Tests (#TXA-WB96G).

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.
R3	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 2 x 60</i>) mL ANTI-IgG-KONJUGAT (Gebrauchsfertig – blaue Lösung).	Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren.
R5	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) mL SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen).	Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren.
R6	1	Fläschchen mit 60 (<i>60, 250</i>) mL WASCHKONZENTRAT 10X PUFFER (Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden – farblose Lösung).	Puffer + Tensid.
R10	1	Röhrchen mit 100 (<i>100, 2 x 100</i>) µL POSITIVEM KONTROLLSERUM (Gebrauchsfertig – rote Kappe).	Puffer + Sammelprobe von Humansen mit positiver <i>Toxocara</i> -Serologie + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren.

R1: Der Buchstabe vor jeder Streifennummer ist spezifisch für den Parameter.

R2, R3, R5 und R6 sind Bestandteil aller Kits LDBIO Diagnostics 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 Diagnostics), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.**

R10 wird im Immunoblot gemäß einer Referenzcharge kalibriert und ist nur dieser Technik gewidmet.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

EUH 210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich as well as on our website sowie auf unserer Website www.ldbiodiagnostics.com

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 LDBIO #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, 25 µL, 1,2 mL und 2 mL).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser. Saugpapier (z. B. Whatman Filterpapier), transparentes Klebeband.
- Handschuhe, 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. Verwenden Sie kein kontaminiertes oder trübes Reagenz. 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. Nur für professionelle Anwendung. Nur für technisch geschultes Personal. 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.
- Die Positivkontrolle ist ein Serum menschlichen Ursprungs, das für die Viren HIV 1 und 2, Hepatitis B und Hepatitis C inaktiviert wurde. Trotzdem muss sie wie ein potenziell infektiöses Produkt behandelt werden. Trotzdem muss sie wie ein potenziell infektiöses Produkt behandelt werden.
- 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.
- Jeder schwerwiegende Vorfall muss Gegenstand einer Erklärung gegenüber dem Hersteller und der zuständigen Behörde sein.

Vorsichtsmaßnahmen

- Lesen und interpretieren Sie die Ergebnisse unter direktem weißem Licht.
- Vorzugsweise sollten alle Reagenzien aus derselben Charge verwendet werden. Wenn unterschiedliche Chargen verwendet werden, muss die Rückverfolgbarkeit gewährleistet sein.
- 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 oder positiven Testergebnis führen.

Probenahme

Die Proben aseptisch in trockenen Röhrchen sammeln. Es sind mindestens 10 µL Serum, Kammerflüssigkeit oder CSF erforderlich. Im Fall von Kammerflüssigkeit oder CSF erhöht die Verwendung von 25 µL die Sensitivität des Tests.

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

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierten, ikterischen oder lipämischen Seren beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben mit Vorsicht zu interpretieren.

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. Achten Sie darauf, den verdünnten Puffer gut zu mischen.

Testverfahren

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

1. Für die Proben und C+ positiven Kontrollen muss ein Aufteilungsplan erstellt werden (R10).

Nur durch Anwendung dieser Kontrolle kann der Test technisch validiert und eine Identifikation der spezifischen entwickelten Banden für eine bestimmte Seriennummer festgestellt werden. Ein C+ Streifen kann nicht verwendet werden, um die Ergebnisse von Streifen eines Blots einer anderen Seriennummer zu interpretieren.

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: Lassen Sie die Streifen an der Oberfläche des Puffers etwa 2 Minuten rehydrieren, so dass die Markierung nach oben zeigt. Danach die Schale leicht schütteln, damit die Streifen vollständig in den Puffer einzutauchen.
5. Proben und positive Kontrolle(n) verteilen: gemäß Aufteilungsplan mit 10 µL pro Kanal (möglichst 25 µL bei Kammerwasser oder CSF). Die Wanne nach jeder Dosierung leicht schütteln. Die Wanne auf einen Wippschüttler stellen. **Für 90 Minuten** ± 5 Minuten bei 20-26 °C inkubieren.
6. Waschschritt: 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 Minuten inkubieren. Zweimal wiederholen, dann den Inhalt der Kanäle entleeren. Sicherstellen, dass sich die Streifen während dieser Schritte nicht umdrehen.
7. 1,2 mL eines Anti-IgG-Konjugats (R3) in jeden Kanal geben. Die Wanne auf den Wippschüttler stellen. **Für 60 Minuten** ± 5 Minuten bei 20-26 °C inkubieren.
8. Waschschritt: 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 Minuten** ± 5 Minuten bei 20-26 °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 Waschschriffe hat einen grundlegenden Einfluss auf die Einfärbung des Hintergrunds). Es muss beachtet werden, dass die Streifen beim Trocknen heller 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 Waschschritt 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. Richten Sie die blauen Positionslinien aus. Die Streifen werden mit dem flachen Lineal fixiert und oben an den Streifen transparentes Klebeband angebracht.

Für eine gute Auswertung müssen die Streifen nach Transfer und in ihrer numerischen Reihenfolge mit einem maximalen Abstand von ein paar Millimetern angeordnet sein. 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.

Qualitätskontrolle und Auswertung

Die im Kit vorhandene Serumkontrolle (R10) muss systematisch in alle Immunoblotserien integriert werden. Sie zeigt das typische Profil und ermöglicht die technische Validierung einer guten Testdurchführung (die Banden müssen auf dem Streifen sehr deutlich erscheinen) und die präzise Kalibrierung der Position und Aspekte der spezifischen Banden für die Auswertung der Ergebnisse von Streifen desselben Transfers (gleiche Seriennummer).

Hinweis: Das Positivkontrollprofil (R10) kann je nach Chargennummer der verwendeten Reagenzien variieren. Entsprechende Bilder finden Sie beispielsweise auf unserer Website www.ldbiodiagnostics.com

Beschreibung der Banden

Eine positive Probe kann zahlreiche Banden zwischen 15 und 200 Kilodalton (kDa) zeigen. Bei jeder geprüften Probe sollte mit den oben beschriebenen Auswertungsmaßnahmen nach niedermolekularen (NM) Banden mit 24-35 kDa gesucht werden. Diese gruppierten und gut isolierten Banden sind charakteristisch und allgemein leicht zu finden.

Zwei hohemolekulare (HM) Bandgruppen können eventuell in den Bereichen 70-90 kDa und 100-200 kDa beobachtet werden. Diese Banden sind nicht Toxocariosis-spezifisch: es kann eine Kreuzreaktion mit einer anderen Helminthiasis vorliegen.

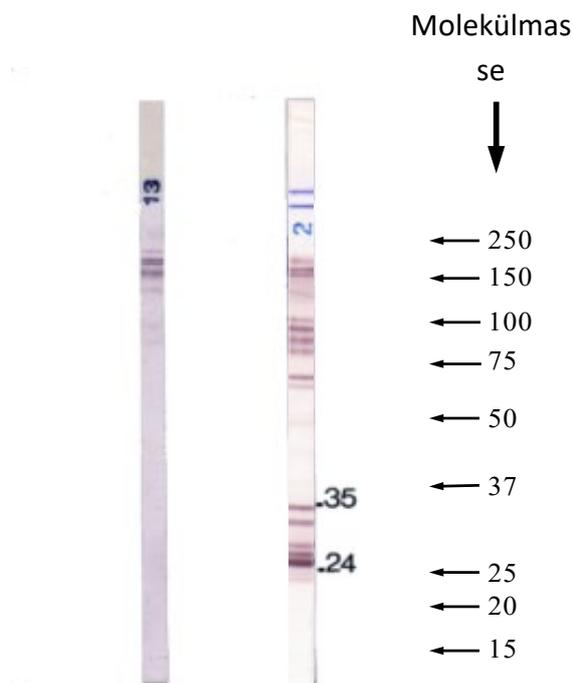


Abb. 1: Beispiele positiver und negativer Ergebnisse

Die Profile sind als Beispiele angegeben. Die Streifen sind mit dem Buchstaben "B" gekennzeichnet, der für den Parameter der Charge "01009" steht.

Auswertung

Das **simultane** Auftreten von 2 Banden zwischen 24 und 35 kDa zeigt das Vorliegen von Anti-*Toxocara* spezifischen Antikörpern an.

Zur Validierung der Ergebnisse muss immer das Profil des Immunoblots jeder Probe mit dem der positiven Kontrolle R10 verglichen werden. Die Aspekte der Banden sind für die Auswertung des Tests wichtig.

Anwendungsbeschränkungen

- Die Diagnose einer Infektionskrankheit kann nicht anhand eines einzigen Testergebnisses gestellt werden.
- Serologische Ergebnisse müssen gemäß den verfügbaren Informationen (z. B. Epidemiologie, klinische, Bildgebung, Biologie usw.) interpretiert werden, um eine Diagnose zu erstellen. Sie sollten nicht allein aufgrund ihrer Positivität als Grundlage für die Diagnose verwendet werden.

Leistung (siehe Literaturhinweise)

Der **Toxocara WB IgG** Test war Gegenstand einer Vergleichsstudie mit dem Referenz-Immunoblot des Toulouse CHU (Universitätsklinik). Die Auswertungskriterien und die Leistung der beiden Tests sind gut vergleichbar.

Sensibilität

Die Daten der Fachliteratur beschreiben die exzellente Sensibilität des **Toxocara WB IgG** Tests, die oft deutlich höher ist als die des ES ELISA Screeningtests, und den Immunoblot als Diagnose und Bestätigungstechnik bestätigt.

Hinweis: Der numerische Wert der Sensibilität kann nicht berechnet werden, weil eine diagnostische Referenzmethode fehlt.

Spezifität

Die Spezifität der 24–35 Banden des ES-Antigens beträgt 100 %. Die Banden außerhalb dieses Bereichs werden nicht als spezifisch betrachtet.

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

- C. N. L. Macpherson, « The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance », *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, n° 12-13, p. 999-1008, nov. 2013.
- J. F. Magnaval, R. Fabre, P. Maurières, J. P. Charlet, et B. de Larrard, « Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis », *Parasitol. Res.*, vol. 77, n° 8, p. 697-702, 1991.
- J. Fillaux et J.-F. Magnaval, « Laboratory diagnosis of human toxocariasis », *Vet. Parasitol.*, vol. 193, n° 4, p. 327-336, avr. 2013.
- B. Gavignet, R. Piarroux, F. Aubin, L. Millon, et P. Humbert, « Cutaneous manifestations of human toxocariasis », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 59, n° 6, p. 1031-1042, déc. 2008.
- A. Nicoletti, V. Sofia, A. Mantella, G. Vitale, D. Contrafatto, V. Sorbello, R. Biondi, P.-M. Preux, H. H. Garcia, M. Zappia, et A. Bartoloni, « Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Italy », *Epilepsia*, vol. 49, n° 4, p. 594-599, avr. 2008.
- M. Zibaei, F. Firoozeh, P. Bahrami, et S. M. Sadjjadi, « Investigation of Anti-Toxocara Antibodies in Epileptic Patients and Comparison of Two Methods: ELISA and Western Blotting », *Epilepsy Res. Treat.*, vol. 2013, p. 1-5, 2013.
- E. Artinyan, H. K. Uysal, O. Akgul, S. Altiparmak, et Y. A. Oner, « Research on Toxocara canis antibodies obtained from patients with eosinophilia », *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 32, n° 4, p. 383-386, déc. 2014.
- C. Incorvaia, Qualizza, Grande, et L. Allegra, « Seroprevalence of IgG anti-Toxocara species antibodies in a population of patients with suspected allergy », *Int. J. Gen. Med.*, p. 783, nov. 2011.
- J. Logar, B. Šoba, A. Kraut, et B. Stirn-Kranjc, « Seroprevalence of Toxocara antibodies among patients suspected of ocular toxocariasis in Slovenia », *Korean J. Parasitol.*, vol. 42, n° 3, p. 137, 2004.

Update-Benachrichtigung - bitte sorgfältig lesen

Veröffentlichungsdatum	Version	SÄNDERUNGS-ZUSAMMENFASSUNG
28/07/2021	Vs 14	Beseitigung der Sicherheitswarnung R5 - Kontakt-E-Mail-Adresse – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Neue Adresse
21/12/2022	Vs16	R6 ohne NaN3. Streifen mit Buchstabe B gekennzeichnet. Möglicherweise Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.



NF EN ISO 13485

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