

TOXOCARA

CE



Western Blot IgG

In vitro diagnosztika Immunoblot vizsgálat
Félautomatizált / manuális technika

#TXA-WB24G: 24 tests

#TXA-WB12G: 12 tests

#TXA-WB96G: 96 tests

HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

További információt és használati utasítást az Ön nyelvén a
www.ldbiodiagnostics.com honlapon talál

Rendeltetésszerű használat

Az **TOXOCARA IgG Western Blot (WB) IgG** egy egyszer használatos kvalitatív szerológiai módszer, mely a toxocariasis meghatározására, valamint a klasszikus szűrővizsgálat során kapott pozitív és kétes eredmények megerősítésére szolgál. A teszt sérumból és cerebrospinális folyadékból (CSF), illetve vizes humorális folyadékból végezhető.

A vizsgálat elve

Western Blot technika

Az excretoriális/secretoriális (ES) *Toxocara canis* antigéneket, elektroforézis segítségével elkülönítik úgy, hogy az elektroblottolás során a 24 részre vágható (1-24-ig elnevezett) nitrocellulóz membrán (más néven transzfer) felszínéhez kötődik.

A vizsgálat lefolytatása

Minden egyes beteganyagot külön tesztcsíkon vizsgálunk. A mintában potenciálisan jelen lévő specifikus ellenanyagok szelektív módon kapcsolódnak az antigénekhez. Az alkalikus-foszfátáz anti-humán IgG konjugátum azután kötődik magához a kikötődött ellenanyagokhoz. Végezeül, az immunkomplexek reakcióba lépnek a szubsztráttal. Az antigéneket felismert mintában jelen lévő IgG specifikus ellenanyagok a tesztcsíkon lila transzverzális sávokként jelennek meg.

A kit által biztosított reagensek és anyagok

Alapértelmezés: 24 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TXA-WB24G)

dőlt: 12 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TXA-WB12G) félkövér: 96 vizsgálatra elegendő tesztcsomag (#TXA-WB96G)

Azonosító	Mennyiség	Leírás	Összetétel
R1	1	24 TESZTCSÍKOT tartalmazó csomag (12, 4x24): előre bemetszett és színes standardokkal (Mindegyik csomag és mindegyik transzfer egyedi gyártási számmal ellátott).	Érzékenyített nitrocellulóz. Színes Molekuláris súlymarkerek (kDa): Kék: 250, Kék: 150, Kék: 100, Rózsaszín: 75, Kék: 50, Zöld: 37, Rózsaszín: 25, Kék: 20, Kék: 15.
R2	1	30ml-es (30, 125) MINTA PUFFER (Használatra kész – rózsaszín oldat).	Puffer + felületaktív anyag.
R3	1	30ml-es (30, 2x60) ANTI IgG KONJUGÁTUM (Használatra kész – kék oldat).	Puffer + anti-humán IgG poliklonális kecske szérum alkalikus-foszfátázzal konjugáltatva + NaN3 (<0.1%) + stabilizátorok
R5	1	30ml-es (30, 125) SZUBSZTRÁT (Használatra kész – barna oldat).	Puffer + NBT + BCIP + stabilizátorok
R6	1	60ml-es (60, 250) MOSÓ KONCENTRÁTUM 10X PUFFER (Desztillált vízben 10-szeresre kell hígítani – színtelen oldat).	Puffer + felületaktív anyag.
R10	1	100µl mennyiségű (100, 2x100) of POZITÍV KONTROL SZÉRUM (Használatra kész – piros kupak).	Puffer + poolozott humán <i>Toxocara</i> pozitív szérum + NaN3 (<0.1%) + stabilizátorok

Az R1: Az egyes szalagszámok előtti betű a paraméterre jellemző.

Az R2, R3, R5 és R6 azonosítójú reagensek az összes kithoz általánosak LDBIO Diagnostics és egyedi gyártási számmal ellátottak, mely csak a gyártási időpontjuktól függ. **Ajánlott többparaméteres vizsgálatot végezni (lásd az LDBIO Diagnostics immunoblot tartományt) a kinyitott ampullák számának korlátozása és a jobb minőség-ellenőrzés biztosítása érdekében.**

Az R10-t immunoblottal kalibrálják egy referencia tétel szerint, és csak erre a technikára szolgál.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek.

EUH 210 Kérésre biztonsági adatlap kapható és a weboldalunkon www.ldbiodiagnostics.com.

A kit által nem biztosított, de szükséges reagensek és anyagok

- Többcsatornás polipropilén inkubációs tálcák a mini-blottokhoz (#WBPP-08 vagy ezzel megegyező).
- Keverő/rázató laboratóriumi eszköz az immunoblottokhoz, a folyadékokhoz szükséges vákurendszer (#WBPP-08 csövek, melyek egyszerűen elforgatással üríthetőek).
- A mintákhoz szükséges csövek és további műanyagáruk, szakszerű cilinderek, és felfogó tartályok. Automatikus pipetták, mikropipetták és eldobható, egyszer használatos hegyek (10 µl, 25µl, 1.2 ml és 2 ml térfogatúak).
- Desztillált vagy ionmentesített víz. Abszorbens papír (például Whatman szűrőlapok), átlátszó ragasztószalag.
- Gumikesztyű, csipeszek a tesztcsíkok kezeléséhez, vágóeszköz vagy szike, lapos átlátszó vonalzó.

Megjegyzés: A reagenseink automatizált immunoblot processzorokban használhatóak. **Amennyiben másik gyártó reagenseivel működtetik a processzort, úgy figyeljen az ebből adódó lehetséges kémiai kontamináció** (ismert példa: TWEEN 20 oldattal történő szennyezés) és bakteriális kontamináció elkerülésére. Tartsa az injekciós üvegeket a processzorhoz. A vizsgálati folyamatot követően, ne tegye vissza a felhasznált reagenseket az eredeti injekciós üvegbe.

Tárolás és Stabilitás

2-8°C között tárolandó. A kitben lévő reagensek a külső dobozon és a csöveken feltüntetett lejárati ideig stabilak. Ne használjon szennyezett vagy zavaros reagenseket. A mosó puffer 1/10-es hígítása 2 hónapig stabil +2 és +8°C közötti hőmérsékleten és egy hétig szobahőmérsékleten.

Óvintézkedések

Biztonság

- Kizárólag *in vitro* diagnosztikai célú felhasználásra. Csak professzionális használatra. Csak műszakilag képzett személyzet számára. Kezelje a Jó Laboratóriumi Gyakorlatnak (GLP) megfelelően és tekintse a reagenseket és bármely mintát potenciálisan fertőzőnek és/vagy toxikusnak.
- Viseljen laboratóriumi köpenyt, gumikesztyűt és védőszemüveget; ne egyen, ne igyon és ne dohányozzon a laboratóriumban. Ne pipetázzon szájjal.
- A pozitív kontroll egy emberi eredetű szérum, amelyet inaktiváltak HIV 1 és 2, hepatitis B és hepatitis C vírusok ellen. Bár továbbra is potenciálisan fertőzőtt terméknek kell tekinteni.
- NBT és BCIP keveréket tartalmaz a szubsztrát, bőrrel való és nyálkahártyán keresztüli érintkezés, valamint belégzés során toxikus.
- A reagensek nátrium-azidot tartalmaznak, mely ólommal és rézzel robbanékony fémsókat képezhetnek. A kiömlött anyagot öblítse le vízzel.
- A kidobandó hulladékot (minták, pipettahegyek, csövek, mosófolyadék, felhasznált reagensek...) a munkahelyi szabályozásoknak és az országban érvényes előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa.
- Minden súlyos eseményről nyilatkozatot kell benyújtani a gyártónak és az illetékes hatóságnak.

Óvintézkedések

- Olvassa el és értelmezze az eredményeket közvetlen fehér fény alatt.
- Célszerű az összes reagenseket ugyanabból a tételből használni. Különböző tételek használata esetén biztosítani kell a nyomon követhetőséget.
- Használja a tesztcsíkokat a számozott sorrendben. Ne keverje a különböző gyártási számú tesztcsíkokat, használja a transzfereket egymás után. A vizsgálat előtt hozzon létre egy speciális beállítási munkatervet.
- Ne érjen a tesztcsíkokhoz az ujjával, használjon csipeszt a kezelésükhöz.
- A reagenseket használatuk előtt alaposan össze kell keverni, különösen a koncentrált mosópuffert.
- Használat után zárja be a flaskákat, ne használja, ha egy anyag véletlenül bekerült a reagensbe. Ne használjon reagenst olyan injekciós flaskából, amely a szivárgás jeleit mutatja. Ne használja a zavaros vagy kicsapódott oldatot.
- Használjon kizárólag eldobható, egyszer használatos pipettahegyeket. Kerülje a csatornák közötti kontaminációt. Ügyeljen arra, hogy ne keletkezzen a pipettahegyek végeiben hab vagy buborék (a reagens flaskák bakteriális kontaminációja).
- Az inkubációs tálcákat csak desztillált vízzel tisztítsa (soha ne használjon detergenset vagy hipót).
- A minta kihagyása vagy a minta nem megfelelő térfogata negatívvá vagy pozitívvá teheti a vizsgálat eredményét, függetlenül annak tényleges állapotától.

Mintavétel

Aszeptikus körülmények között a mintákat száraz csövekbe gyűjtjük. Legalább 10 µl szérum, vizes humorális folyadék, vagy CSF szükséges. Vizes humorális folyadék, vagy CSF esetében 25 µl minta növeli az érzékenységet.

Tartsa a mintákat feldolgozásukig 2-8°C közötti hőmérsékleten. Ha szükséges a minták tárolása, akkor fagyassza a mintákat -20 ± 5°-os hőmérsékleten. Ne használja a kontaminálódott mintákat. Kerülje a minták ismétlődő olvasztását fagyasztását.

A hemolizált, ikterikus vagy lipides szérumok esetében nem tapasztaltunk különös keresztreakciót, ajánlatos az ilyen minták feldolgozásakor a kapott eredményeket körültekintően értelmezni.

Reagensek előkészítése

Mosó puffer: 4 vizsgálatra elegendő mennyiséghez egy tiszta csőben higítsa meg a 10X Mosó Koncentrátumot (R6) úgy, hogy 10ml-jét 90ml desztillált vagy ionmentes vízhez adja. Óvatosan keverje össze a hígított puffert.

Vizsgálati eljárás

Nota Bene: Ajánlott többparaméteres vizsgálatot végezni (lásd az LDBIO Diagnostics immunoblot tartományt) a kinyitott ampullák számának korlátozása és a jobb minőség-ellenőrzés biztosítása érdekében.

1. Készítse el a minták és a pozitív kontroll (C+; R10) beállítási tervét.

Kizárólag ezen kontroll felhasználásával lehet technikailag validálni a vizsgálatot, és az adott sorozatszám alapján azonosítani kell a kialakuló konkrét sávokat. A pozitív kontroll (C+) tesztcsíki nem használható arra, hogy egy másik sorozatszámú blotból származó tesztcsíki eredményeit kiértékelje.

2. Vágja le a szükséges számú tesztcsíki (R1) szike és tiszta és száraz, lapos átlátszó vonalzó segítségével, a kék pozicionáló vonalakat hagyja meg a tesztcsíkiokon. A tesztcsíkiokra nyomja rá szorosan a vonalzót és vágja le a tesztcsíki oldala mentét a csíkiakat (a számok a vonalzón keresztül láthatóak).
3. Az elkészített beállítási tervnek megfelelően a mintatartó tálca egyes csatornáiba osszon el 1,2 ml minta puffert (R2).
4. A számozási sorrendnek megfelelően helyezze el a tesztcsíkiakat a mintatartó tálca csatornáiba úgy, hogy a tesztcsíkiok tetején látható számok felfelé álljanak: Hagyja, hogy a tesztcsíkiok felülete körülbelül 2 percig rehidratálódjon a minta puffertben, majd óvatosan ütögessen meg a tálcat, hogy teljesen elmerüljenek a puffertben.
5. A minták és a pozitív kontroll kiosztása: a beállítási munkaterv alapján a mintákból és a kontrollból a megfelelő helyekre 10 µl-t mérjünk a mintatartó tálca csatornáiba (vizes humorális minta, vagy CSF esetében megfelelőbb az 25 µl). Minden bemérésnél alaposan ütögessen meg a tálcat. Az utolsó bemérést követően a tesztcsíki tároló tálcat helyezze egy keverő/rázató berendezésre. Helyezze a tálcat rázó inkubátorra és az alábbiak szerint inkubálja rázatva: **90±5 percig**, 20-26°C közötti hőmérsékleten.
6. Mosási lépés: Ürítse ki a csatornák tartalmát vagy Pasteur pipetta segítségével vagy pedig az inkubációs tálca felfordításával. A tálca egyes csatornáiba 2-3ml hígított mosópuffert pipettázzon. Inkubálja a keverő/rázató eszközön a tesztcsíkiokat 3 percig. Ismétlje meg az előző folyamatot kétszer, majd ürítse ki a csatornák tartalmait. Bizonyosodjon meg affelől, hogy a tesztcsíkiok nem fordultak meg ezen lépések alatt.
7. Adjon 1,2 ml anti-IgG konjugátumot (R3) minden egyes csatornába. Helyezze a tálcat a keverő/rázató eszközre. **Inkubálja 60±5 percig**, 20-26°C közötti hőmérsékleten.
8. Mosási lépés: Ismétlje meg a 6. lépést.
9. Adjon 1,2 ml NBT/BCIP szubsztrát keveréket (R5) minden egyes csatornához. Helyezze a tálcat a keverő/rázató eszközre és most már védje meg a tesztcsíkiokat a közvetlen napfénytől. Majd így **inkubálja 60±5 percig**, 20-26°C közötti hőmérsékleten a csíkiakat.

Az inkubációs paramétertől függetlenül folyamatosan figyelje a szín fejlődését. A színfejlődés leállítható, ha a tesztcsíki háttérszíne sötétebbé válik, ami megnehezíti a leolvasást (a mosási lépések minősége alapvetően befolyásolja a háttérszínt). Ne feledje, hogy a tesztcsíkiok kivilágosodnak, ha megszáradtak.

10. Állítsa le a reakciót a szubsztrát vagy Pasteur pipettával történő leszívásával vagy az inkubációs kád felfordításával, majd 2 ml desztillált vizet adjon minden egyes csatornába. Ismétlje meg ezt az utolsó mosási lépést még egyszer.
11. Tesztcsíkiok megszáritása: A még vízzel telített csatornákból vegye ki csipesz segítségével a tesztcsíkiokat, majd jól látható módon, a számozott végükkel helyezze el Whatman abszorbens szűrőpapírra. Hagyja megszáradni a tesztcsíkiokat a levegőn.
12. Tárolás: Tegye át a megszáradt tesztcsíkiokat egy papírlapra, amit az archiváláshoz fog használni. Igazítsa a tesztcsíkiokat a pozicionáló vonalak egymáshoz illesztésével. Tartsa tesztcsíkiokat a lapos vonalzó segítségével ebben a helyzetben, majd átlátszó ragasztószalaggal ragassza a tesztcsíkiokat a laphoz a felső részüknél fogva.

A megfelelő kiértékelés érdekében, a tesztsíkokat a számsorrendben kell egymáshoz igazítani, egymástól legfeljebb néhány milliméter távolságra. Az egymástól távol eső tesztsíkok összehasonlítása nem megbízható a kiértékelés során (például 2. a 15. tesztsíkhhoz képest). **Nagyon kerülendő** (fals eredményt eredményez) azon tesztsíkok összehasonlítása, melyek különböző kitekből (tesztsíkok eltérő gyártási számúak) származnak.

Minőség-ellenőrzés és kiértékelés

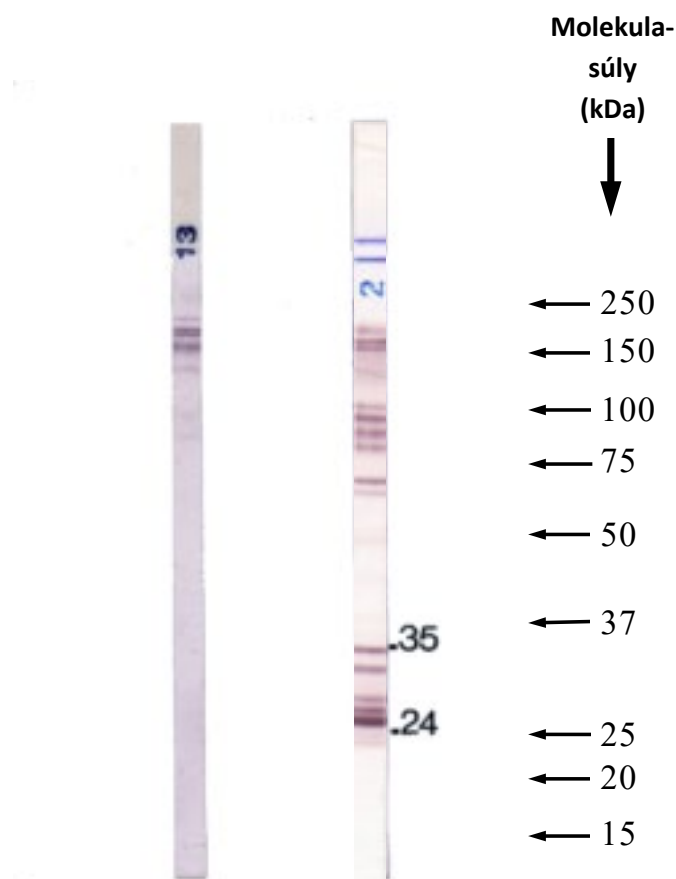
A kithoz biztosított szérum kontrollt (R10) szisztematikusan be kell állítani minden immunoblot vizsgálatkor. Megmutatja a tipikus profilt és lehetővé teszi a vizsgálat megfelelő lefolyásának technikai validálását (a tesztsíkon a sávoknak nagyon tisztán olvashatónak kell lenniük), és bekalibrálja pontosan a pozíciót és a specifikus sávokat, így lehetővé téve a tesztsíkok eredményeinek kiértékelését a hasonló transzferhez (hasonló gyártási számú) képest.

Nota Bene: A pozitív kontroll (R10) profilja az alkalmazott reagensek tételszámától függően változhat. A megfelelő képek a www.ldbiodiagnostics.com weboldalon található példaként.

A sávok jellemzői

A pozitív minta esetén számos sáv jelenhet meg, melyek a 15 és 200 kilodalton (kDa) között találhatóak. Keressük a sávokat a 24-35 kDa alacsony molekulásúlyú tartományban a fenti identifikálási eszközt használva. Ezek a sávok jól csoportosíthatók, jól izoláltak, karakterisztikusak és általában könnyen megtalálhatók.

Sávok két csoportja található esetleg a 70-90 kDa és 100-200 kDa magas molekulásúlyú tartományban. Ezek nem specifikusak a toxocariasisra, valószínűleg keresztreakciók egyéb helminthiasisokkal.



1.ábra: példák negatív és pozitív eredményekre

A profilok példaként szerepelnek. A csíkokat az "01009" tételtől származó paraméterre jellemző "B" betűvel jelöltük.

Kiértékelés

Két sáv **egyidejű** megjelenése a 24 és 35 kDa tartományban anti-*Toxocara* specifikus antitestek jelenlétére utal.

Az eredmények validálásához mindig hasonlítsa össze az egyes minták immunoblotjának profilját az R10 pozitív kontroll profiljával. A sávok megjelenése, helyzete fontos a vizsgálat kiértékelésekor.

A kit korlátjai

- A fertőző betegség diagnózisát egyetlen vizsgálati eredmény alapján nem lehet felállítani.
- A szerológiai eredményeket az elérhető információkkal (például járványügyi, klinikai, képalkotói, biológiai stb.) együtt kell értelmezni és a diagnózist felállítani. Ezek nem használhatók a diagnózis alapjául pusztán a pozitivitásuk alapján.

Teljesítményjellemzők (lásd az irodalmi hivatkozásokat)

A **Toxocara WB IgG** tesztet a Toulouse CHU (University Hospital Centre) referencia immunoblotjával hasonlították össze.

A két teszt kiértékelési szempontjai és teljesítménye összehasonlítható volt.

Érzékenység

Az irodalomból származó adatok kiváló érzékenységet írnak le a **Toxocara WB IgG** tesztre, gyakran jelentősen magasabbat, mint az ES szűrő ELISA teszteké, megerősítve ezzel az immunoblotok helyét a diagnosztikai és megerősítő technikákban.

Megjegyzés: Az érzékenységre vonatkozó számszerű adat nem jeleníthető meg a referencia módszer hiánya miatt.

Specifitás

Az ES antigénekből származó 24-35 sávok specifitása 100%. Az ezen kívül eső sávok nem tekinthetők specifikusnak.

Reprodukálhatóság

Megvizsgálták a sorozatok közötti és a lot-ok közötti reprodukálhatóságot. Mindkét esetben, a szérum-szérum korreláció a specifikus sávok vonatkozásában kiválóan bizonyult.

Interferencia

A hemolizált, ikerikus vagy lipides szérumok esetében nem tapasztaltunk különös keresztreakciót, ajánlatos az ilyen minták feldolgozásakor a kapott eredményeket körültekintően értelmezni.

Hibaelhárítás

"A sávok kevésbé kontrasztosak": Bizonyos alacsony ellenanyagtartalmú szérumok ilyen eredményeket adhatnak.

"Árnyékolt területek láthatók, többé-kevésbé színesek, egyhén diffúzak": A tesztcsík nem volt teljesen egyik reagensbe alámerítve és nem volt a leírtaknak megfelelően (teljes időhossz) inkubálva. Foltok megjelenhetnek ott is, ahol a minta rá lett téve a tesztcsíkra, ha a tálca nem volt rázatva a reagens adagolását követően.

"A háttérzaj nagyon jelentős, így a tesztcsík leolvasása nagyon nehézkes": A mosás elégtelen volt, vagy az utolsó inkubáció túl sokáig tartott. Ügyeljen a vizsgálat megfelelően történő kivitelezésére, tartsa be a mosási időket, és biztosítsa a víz minőségét. Csökkentse le az utolsó inkubáció idejét.

Kivételes esetben, bizonyos szérumok nem specifikus módon reagálhatnak. A háttér festés néha úgy nézhet ki, mint egy csík (Mikado aspekt, ld. 1. ábra, 7. csík), mely a leolvasást nagyon nehézé teszi. Ebben az esetben az immunoblot eredménye nem használható.

Ez a nem-specifikus háttérzaj magába foglalhatja a tesztcsík egy részét, így az eredmények az adott terület számára értelmezhetetlen.

"A színfejlődési utolsó lépésben az oldatban csapadék jelenik meg": a szubsztrát valójában részlegesen kicsapódik (fekete pelyhek) a pufferben a színfejlődés végén. Ez a jelenség nem változtatja meg a színfejlődés minőségét, melyet szükséges tovább folytatni. Az utolsó desztillált vizes mosás eltávolítja ezen szilárd részecskéket.

Bibliográfia

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.

Értesítés a frissítésről - olvassa el figyelmesen

Kiadás dátuma	Verzió	Módosítás összefoglaló
28/07/2021	Vs 14	A biztonsági figyelmeztetés eltávolítása R5 - Kapcsolattartó e-mail címe – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Új cím.
21/12/2022	Vs16	R6 NaN3 nélkül. B betűvel jelölt szalag. Különböző tételekből származó reagensek lehetséges használata.



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