

# TOXOCARA



## Western Blot IgG

Diagnostyka *in vitro* Test immunoblotu  
Technika półautomatyczna / ręczna

#TXA-WB24G: 24 testów

#TXA-WB12G: 12 testów

#TXA-WB96G: 96 testów

## INSTRUKCJA UŻYCIA

Więcej informacji i instrukcje użytkowania w swoim języku można znaleźć na naszej stronie internetowej [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## PRZEZNACZENIE

**TOXOCARA Western Blot (WB) IgG** to test jednorazowego użytku jakościowy służący do diagnozowania serologicznego IgG za pomocą testu Immunoblot na toksokarozę przeznaczony do prowadzenia badań potwierdzających dla dodatnich lub niejednoznacznych wyników uzyskanych w klasycznych badaniach przesiewowych. Można go przeprowadzać na surowicy, płynie rdzeniowo-kręgowym (CFS) lub cieczy wodnistej.

## ZASADA DZIAŁANIA TESTU

### Technika Western Blot

Antygeny wydalania/wydzielania (ES) *Toxocara canis*, po ich oddzieleniu za pomocą elektroforezy, zostają związane poprzez electroblotting z powierzchnią membrany nitrocelulozowej (jest to tzw. transfer) podzielonej na 24 paski ponumerowane od 1 do 24.

### Wykonanie testu

Każdą próbkę przeznaczoną do testu inkubuje się osobno za pomocą paska. Swoiste przeciwciała potencjalnie obecne w próbce wiążą się selektywnie z antygenami. Następnie koniugat fosfatazy alkalicznej i przeciwciała przeciwludzkiego IgG wiąże się ze związanymi przeciwciałami. Na koniec, immunokompleksy reagują z substratem. Antygeny rozpoznane przez swoiste przeciwciała typu IgG obecne w próbkach są widoczne jako fioletowe, poprzeczne pasma.

## ZAWARTE ODCZYNNIKI

Domyślnie: pakiet 24 testów (#TXA-WB24G)

kursywa: pakiet 12 testów (nr TXA-WB12G) – **tlusty druk**: Pakiet 96 testów (nr TXA-WB96G).

ID	Ilość	Opis	Skład
R1	1	Pakiet(y) 24 (12, <b>4x24</b> ) PASKÓW: wstępnie przycięte + kolorowe wzorce. (Każdy pakiet i każdy transfer jest oznaczony niepowtarzalnym numerem seryjnym)	Uwrażliwiona nitroceluloza Oznaczona kolorami masa cząsteczkowa (kDa): Niebieski: 250, Niebieski: 150, Niebieski: 100, Różowy: 75, Niebieski: 50, Zielony: 37, Różowy: 25, Niebieski: 20, Niebieski: 15.
R2	1	Fiolka 30 (30, <b>125</b> ) ml ROZTWORU BUFOROWEGO (Gotowy do użycia - różowy roztwór).	Roztwór buforowy + środek powierzchniowo czynny.
R3	1	Fiolka zawierająca 30 (30, <b>2x60</b> ) ml KONIUGATU ANTY IgG (Gotowy do użycia - niebieski roztwór).	Roztwór buforowy + poliklonalna surowica z kozim przeciwludzkim IgG skoniugowana z fosfatazą alkaliczną + NaN <sub>3</sub> (<0,1%) + stabilizatory.
R5	1	Fiolka 30 (30, <b>125</b> ) ml SUBSTRATU (Gotowy do użycia - nieprzeźroczysta brązowa fiolka).	Roztwór buforowy + NBT + BCIP + stabilizatory.
R6	1	Fiolka 60 (60, <b>250</b> ) ml KONCENTRATU DO PRZEMYWANIA 10X ROZTWÓR BUFOROWY (Do 10-krotnego rozcieńczenia w wodzie destylowanej - bezbarwny roztwór).	Roztwór buforowy + środek powierzchniowo czynny.
R10	1	Probówka 100 (100, <b>2x100</b> ) µl DODATNIEJ SUROWICY KONTROLNEJ (Gotowa do użycia - czerwony korek).	Roztwór buforowy + pula próbek ludzkiej surowicy z dodatnią serologią <i>Toxacara</i> + NaN <sub>3</sub> (<0,1%) + stabilizatory.

**R1:** Litera przed każdym numerem paska jest specyficzna dla parametru.

**R2, R3, R5 i R6** są wspólne dla wszystkich zestawów i mają niepowtarzalny numer partii uzależniony wyłącznie od daty produkcji. **Zaleca się przeprowadzenie testów wieloparametrowych (patrz przedział Immunoblot LDBIO Diagnostics) w celu ograniczenia liczby otwartych fiolek i zapewnienia lepszej kontroli jakości.**

**R10** jest kalibrowany w immunoblot zgodnie z serią referencyjną i jest przeznaczony tylko do tej techniki.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

EUH 210 Karta charakterystyki dostępna na żądanie i na naszej stronie internetowej [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com).

## DODATKOWE WYMAGANE MATERIAŁY NIE ZOSTANĄ ZAPEWNIONE

- Wielokanałowe, polipropylenowe kuwety inkubacyjne do prowadzenia testów typu mini-blot (nr WBPP- 08 lub równoważny).
- Platforma kołysząca do testów Immunoblot, system próżniowy do płynów (wanienki WBPP- 08, które dostarczamy mogą zostać opróżnione poprzez obrócenie).
- Probówki i materiały do pobierania próbek, kolby z podziałką, specjalne pojemniki. Automatyczne pipety, mikropipety i końcówki jednorazowego użytku (o objętości 10 µl, 25 µl, 1,2 ml i 2 ml).
- Woda destylowana lub dejonizowana. Papier absorpcyjny (np. bibuła Whatman), przezroczysta taśma klejąca.
- Rękawice, pinceta do przenoszenia pasków, obcinak lub skalpel, płaska przezroczysta linijka.

**Uwaga:** Nasze odczynniki mogą być wykorzystywane w automatycznym analizatorze Immunoblot. **Należy zachować ostrożność w celu uniknięcia możliwego skażenia chemicznego naszych odczynników, jeśli w analizatorze stosowane są również odczynniki innego producenta** (znany przykład: skażenie TWEEN 20), i skażenie bakteryjne. Zachować fiołki do analizatora. Po przetworzeniu nie wlewać pozostałości użytych odczynników z powrotem do oryginalnych fiołek.

## PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ

Przechowywać w temperaturze od 2 do 8 °C. Odczynniki z zestawu zachowują stabilność do daty ważności wskazanej na opakowaniu zewnętrznym i etykietach fiołek. Nie używać zanieczyszczonego lub mętnego odczynnika. Roztwór buforowy rozcieńczony do 1/10 zachowuje stabilność przez 2 miesiące w temp. +2 to +8 °C oraz przez jeden tydzień w temperaturze pokojowej.

# ŚRODKI OSTROŻNOŚCI DOTYCZĄCE STOSOWANIA

## Bezpieczeństwo stosowania

- Wyłącznie do zastosowań *in vitro*. Tylko do użytku profesjonalnego. Tylko dla przeszkolonego technicznie personelu.
- Przestrzegać zasad Dobrej praktyki laboratoryjnej i traktować każdy odczynnik i każdą próbkę jako potencjalnie toksyczne i/lub zakaźne.
- Nosić kitel laboratoryjny, rękawice i okulary; nie pić, nie jeść i nie palić w laboratorium. Nie wkładać pipet do ust.
- Kontrolą pozytywną jest surowica pochodzenia ludzkiego inaktywowana pod kątem wirusów HIV 1 i 2, zapalenia wątroby typu B i zapalenia wątroby typu C. Należy ją jednak traktować jako produkt potencjalnie zakaźny.
- Substrat zawiera mieszkankę NBT i BCIP, toksyczny w kontakcie (ze skórą i błoną śluzową) oraz przy wdychaniu.
- Odczynniki zawierają azcydek sodu, który może tworzyć wybuchowe sole metaliczne z ołowiem i miedzią. Wszelkie rozlane odczynniki sflukać wodą.
- Utylizacja odpadów (próbki, końcówki, płyn do przemywania, zużyty odczynnik...) zgodnie z dobrą praktyką stosowaną w branży i przepisami obowiązującymi w danym kraju.
- Każdy poważny incydent musi być przedmiotem deklaracji skierowanej do producenta i właściwego organu.

## Środki ostrożności

- Przeczytaj i zinterpretuj wyniki w bezpośrednim świetle białym.
- Zaleca się stosowanie wszystkich odczynników z tej samej partii. Jeśli używane są różne partie, należy zapewnić możliwość śledzenia ich losów.
- Paski wykorzystywać w porządku numerycznym. Nie łączyć pasków o różnych numerach seryjnych, transfery należy stosować kolejno. Przed rozpoczęciem testu należy ustalić specjalny plan dystrybucji.
- Nie dotykać pasków placami, korzystać z pincety.
- Odczynniki należy dobrze wymieszać przed użyciem, w szczególności skoncentrowany roztwór buforowy do przemywania.
- Zamknąć fiołki po użyciu, nie używać, jeśli do odczynników wprowadzono przypadkiem inną substancję. Nie używać odczynnika z fiołki noszącej oznaki wycieku. Nie używać roztworu mętnego lub ze strątem.
- Stosować wyłącznie końcówki pipety przeznaczone do jednorazowego użytku. Unikać skażenia pomiędzy poszczególnymi kanałami. Obserwować końcówki pod kątem tworzenia się piany i pęcherzyków powietrza w ich wnętrzu (skażenie bakteryjne fiołek z odczynnikiem).
- Kuwety inkubacyjne czyścić wodą destylowaną (w żadnym przypadku nie stosować detergentów ani wybielacza).
- Pominięcie próbki lub dystrybucja nieprawidłowej objętości może spowodować uzyskanie negatywnym lub pozytywnym wynikiem testu, niezależnie od rzeczywistego stanu.

## POBIERANIE PRÓBEK

Aseptycznie pobrać próbki do suchych probówek. Wymagane jest co najmniej 10 µl surowicy, cieczy wodnistej lub płynu rdzeniowo-mózgowego. W przypadku cieczy wodnistej lub płynu rdzeniowo-mózgowego zastosowanie 25 µl zwiększy czułość testu.

Próbki należy utrzymywać w temperaturze 2-8 °C do czasu ich przetwarzania. Jeżeli próbki mają być przechowywane dłużej niż tydzień, należy je zamrozić w temperaturze -20 ± 5 C. Nie używać skażonych próbek. Unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania próbek.

Nawet jeśli nie zaobserwuje się szczególnych reakcji krzyżowych w zhemolizowanych, ikteryicznych lub lipemicznych próbkach surowicy, zaleca się ostrożną interpretację wyników uzyskanych z takich próbek.

## PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

**Roztwór buforowy do przemywania:** Do 4 testów, w czystej butelce, rozcieńczyć 10 ml koncentratu do przemywania 10X (R6) w 90 ml wody destylowanej lub dejonizowanej. Uważaj, aby dobrze wymieszać rozcieńczony bufor.

## PROCEDURA PROWADZENIA TESTU

*Proszę zauważyć:* Zaleca się przeprowadzenie testów wieloparametrowych (patrz przedział Immunoblot LDBIO Diagnostics) w celu ograniczenia liczby otwartych fiolek i zapewnienia lepszej kontroli jakości.

1. Przygotować plan dystrybucji dla próbek i kontroli dodatniej C+ (R10).

Tylko zastosowanie tej kontroli umożliwia przeprowadzenie technicznej walidacji i identyfikacji testu, dla danego numeru seryjnego, widocznych swoistych pasm. Paska C+ nie można użyć do interpretacji wyników pasków z testu typu blot o innym numerze seryjnym.

2. Pociąć odpowiednią ilość pasków (R1) za pomocą skalpela i czystej, płaskiej, przezroczystej linijki, utrzymując niebieską linię pozycjonującą na paskach: mocno przytrzymać paski w miejscu za pomocą linijki i ciąć je obok szczepu (numery są widoczne przez linijkę).
3. Wprowadzić 1,2 ml roztworu buforowego (R2) do każdego kanału zgodnie z ustalonym planem.
4. Umieścić ponumerowane paski w kanałach w porządku numerycznym. Należy odczekać, aby paski się ponownie nawodniły na powierzchni roztworu buforowego przez ok. 2 minuty, tak aby numer był widoczny na górze, **NASTĘPNIE** delikatnie potrząsnąć kuwetą, aby całkowicie zanurzyć je w roztworze buforowym.
5. Rozłożyć próbki i dodatnie próbki kontrolne zgodnie z planem dystrybucji, po 10 µl na kanał (najlepiej 25 µl dla cieczy wodnistej lub płynu rdzeniowo-mózgowego). Delikatnie potrząsnąć kuwetą po każdym nałożeniu. Umieścić kuwetę na platformie kołyszącej. **Inkubować przez 90 min ± 5 min** w temp. 20-26 °C.
6. Krok przemywania: Opróżnić kanały za pomocą pipety Pasteura lub poprzez odwrócenie kuwety inkubacyjnej. Nałożyć 2 do 3 ml rozcieńzonego roztworu buforowego do przemywania do każdego kanału. Inkubować na platformie kołyszącej przez 3 min. Powtórzyć dwukrotnie, następnie opróżnić zawartość kanałów. Zwrócić uwagę na to, aby paski nie odwróciły się podczas tych kroków.
7. Nałożyć 1,2 ml koniugatu anty-IgG (R3) do każdego kanału. Umieścić kuwetę na platformie kołyszącej. **Inkubować przez 60 min ± 5 min** w temp. 20-26 °C.
8. Step przemywania: powtórzyć krok 6.
9. Nałożyć 1,2 ml substratu NBT/BCIP (R5) do każdego kanału. Umieścić na platformie kołyszącej i chronić przed bezpośrednim światłem **Inkubować przez 60 min ± 5 min** w temp. 20-26 °C.

Bez względu na parametr monitorować rozwój koloru. Rozwój można zatrzymać, jeśli kolor w tle paska ciemnieje do punktu, w którym odczyt jest utrudniony (jakość kroków przemywania ma istotny wpływ na kolor w tle). Proszę pamiętać, że paski będą jaśnieć w miarę wysychania.

10. Zatrzymać reakcję poprzez zassanie substratu za pomocą pipety Pasteura lub poprzez odwrócenie kuwety inkubacyjnej i nałożenie 2 ml wody destylowanej do kanałów. Jeszcze raz powtórzyć ostatni krok przemywania.
11. Suszenie pasków: Kiedy kanały będą nadal wypełnione wodą, chwycić paski pincetą za nienumerowany koniec i położyć ja na papierze absorpcyjnym Whatmana, tak aby numer był widoczny. Pozostawić do wyschnięcia. Kolor pasków zrobi się naturalnie jaśniejszy podczas suszenia. Interpretację można przeprowadzić dopiero po zakończeniu suszenia.
12. Przechowywanie: Przenieść paski na arkusz papieru, który zostanie użyty do ich archiwizacji. Wyróżnić linie pozycjonujące. Przytrzymując je w miejscu za pomocą płaskiej linijki, przykleić górną część pasków przezrystą taśmą samoprzylepną.

W celu zapewnienia dobrej interpretacji, paski należy uporządkować według transferu i w porządku numerycznym, w odległości maksymalnie kilku milimetrów od siebie. Porównywania pasków znajdujących się od siebie w dużej odległości (np. nr 2 z nr 15) nie jest wiarygodne. **Niebezpieczne jest** (fałszywe wyniki) porównywanie pasków z różnych zestawów (paski o różnych numerach seryjnych).

## KONTROLA JAKOŚCI I INTERPRETACJA

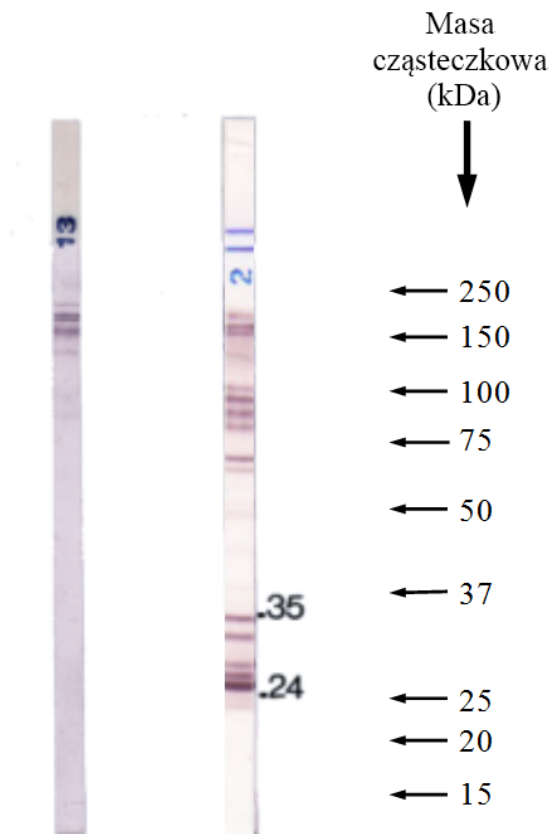
Kontrolę surowicy (R10) dołączoną do zestawu należy systematycznie włączać do każdej serii testów Immunoblot. Pokazuje ona typowy profil i umożliwia techniczną walidację dobrego przeprowadzenia testu (pasma muszą być bardzo wyraźnie widoczne na pasku) i precyzyjną kalibrację pozycji i aspektu określonych pasm w celu umożliwienia interpretacji wyników uzyskanych na paskach z tego samego transferu (ten sam numer seryjny).

*Uwaga:* Profil kontroli pozytywnej (R10) może się różnić w zależności od numeru serii użytych odczynników. Odpowiednie obrazy są dostępne jako przykład na naszej stronie internetowej [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com).

### Opis pasm

Próbka dodatnia może zawierać różne pasma mieszczące się pomiędzy 15 a 200 kilodaltonami (kDa). Należy wyszukać pasma 24-35 kDa o niskiej masie cząsteczkowej (LMW) dla każdej z badanych próbek za pomocą narzędzi identyfikacyjnych opisanych powyżej. Te pasma, pogrupowane i dobrze wyizolowane mają charakterystyczny wygląd i na ogół można je łatwo znaleźć.

Dwie grupy pasm o wysokiej masie cząsteczkowej (High Molecular Weight, HMW) można znaleźć w przedziale 70-90 kDa i 100-200 kDa. Te pasma nie są specyficzne dla toksokarozy: możliwe, że jest to reakcja krzyżowa z inną helmintozą



**Rys. 1:** Przykłady wyników dodatnich i ujemnych

Profile są podane jako przykładowe. Paski oznaczone są literą "B" właściwą dla parametru z partii "01009".

### Interpretacja

**Jednoczesna** obecność 2 pasm pomiędzy 24 a 35 kDa wskazuje na obecność swoistych przeciwciał przeciw *Toxocara*.

Aby przeprowadzić walidację wyników, należy za każdym razem porównać wynik Immunoblot każdej próbki z wynikiem dodatniej kontroli R10. Aspekt pasm jest ważny podczas interpretacji testu.

## OGRANICZENIA ZASTOSOWANIA

- Diagnozy choroby zakaźnej nie można ustalić na podstawie jednego wyniku testu.
- Wyniki serologiczne należy interpretować zgodnie z dostępnymi informacjami (np. epidemiologiczne, kliniczne, obrazowe, biologiczne itp.) w celu ustalenia diagnozy. Nie powinny być one wykorzystywane jako podstawa do diagnozy tylko na podstawie ich pozytywnego wyniku.

## WYDAJNOŚĆ (patrz bibliografia)

Test **Toxocara WB IgG** był przedmiotem badania porównawczego z referencyjnym testem immunoblot z Toulouse CHU (Centrum Szpitala Uniwersyteckiego).

Kryteria interpretacji oraz parametry obu testów były wysoce porównywalne.

### Czułość (Sensitivity, Se):

Dane literaturowe opisują doskonałą czułość testu **Toxocara WB IgG**, często istotnie wyższą niż czułość testów przesiewowych ES ELISA, potwierdzając miejsce testu Immunoblot wśród technik diagnostycznych i potwierdzających.

Uwaga: Nie można obliczyć wartości numerycznej czułości z powodu braku referencyjnej metody diagnostycznej.

### Swoistość - reakcje krzyżowe

Swoistość pasm 24-35 z antygeny ES wynosi 100%. Pasma poza tym przedziałem nie są uznawane za swoiste.

### Odtwarzalność

Przetestowano odtwarzalność pomiędzy seriami i partiami. W obu przypadkach korelacja surowicy do surowicy w odniesieniu do swoistych pasm jest doskonała.

### Interferencje

Nawet jeśli nie zaobserwuje się szczególnych reakcji krzyżowych w zhemolizowanych, ikteryicznych lub lipemicznych próbkach surowicy, zaleca się ostrożną interpretację wyników uzyskanych z takich próbek.

## ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

**„Pasma są blade z niewielkim kontrastem”:** Pewne próbki surowicy z niewielkim stężeniem przeciwciał mogą dawać takie wyniki.

**„Są widoczne obszary zacienione, mniej lub bardziej wybarwione, nieco rozproszone”:** Pasek nie był całkowicie zanurzony w jednym z odczynników i inkubacja nie przebiegła prawidłowo na całej długości paska. Plamy mogą być również obecne, jeśli próbka została umieszczona w kuwecie, która nie została odpowiednio wytrząśnięta po umieszczeniu w niej próbki.

**„Szum jest istotny i bardzo utrudnia odczyt”:** Przemycanie było niewystarczające lub ostatnia inkubacja trwała zbyt długo. Zapewnić dobre techniki testowania, przestrzegać czasów przemycania i zapewnić odpowiednią jakość wody. Skrócić czas ostatniej inkubacji.

W wyjątkowych sytuacjach, pewne próbki surowicy mogą reagować w sposób nieswoisty. W takiej sytuacji wyniku testu Immunoblot nie można wykorzystać.

Nieswoisty szum może występować tylko na fragmencie paska, uniemożliwiając interpretację wyników tylko dla tego fragmentu.

**„W roztworze pojawia się strąk podczas ostatniego kroku rozwoju”:** substrat może rzeczywiście ulec wytrąceniu (czarne

płatki) w roztworze buforowym pod koniec rozwoju. To zjawisko nie wpływa na jakość rozwoju, który należy kontynuować normalnie. Ostatnie przemywanie wodą destylowaną eliminuje obecność cząstek stałych.

## Bibliografia

- 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.

### POWIADOMIENIE O AKTUALIZACJI - przeczytaj uważnie

DATA WYDANIA	WERSJA	PODSUMOWANIE MODYFIKACJI
28/07/2021	Vs 14	Usunięcie ostrzeżenia dotyczącego bezpieczeństwa R5 - Kontaktowy adres e-mail – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Nowy adres.
21/12/2022	Vs16	R6 bez NaN3. Pasek oznaczony literą B. Możliwe użycie odczynników z różnych partii.



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