

FASCIOLA ES

CE



Western Blot IgG

Diagnóstico *in vitro* Ensaio Immunoblot
Técnica manual / semi-automática

#FAS ES-WB24G : 24 testes

#FAS ES-WB12G : 12 testes

#FAS ES-WB96G : 96 testes

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Encontre mais informações e instruções de uso no seu idioma no nosso site

www.ldbiodiagnostics.com

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

FASCIOLA ES Western Blot (WB) IgG é um teste qualitativo de uso único de diagnóstico serológico de IgG por immunoblot para a distomatose, concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste.

PRINCIPIO DO TESTE

Técnica de Western Blot

Os antigénios excretos/secretos (ES) de *Fasciola hepatica*, uma vez separados por eletroforese, são ligados por electroblotting à superfície de uma membrana de nitrocelulose (a que se chama a transferência) cortada em 24 tiras numeradas de 1 a 24.

Condução do teste

Cada amostra de soro a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos anti-*Fasciola* potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antigénios de *F. hepatica*. O conjugado fosfatase alcalina-anti IgG humana liga-se então aos anticorpos anti-*Fasciola*. Por fim, os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antigénios reconhecidos pelos anticorpos anti-*Fasciola* do tipo IgG presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

REAGENTES FORCENIDOS COM O KIT

Padrão: embalagem de 24 testes (#FAS ES-WB24G)

italic: embalagem de 12 testes (#FAS ES-WB12G) - **bold**: Embalagem de 96 testes (#FAS ES-WB96G).

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (<i>12</i> , 4x24) TIRAS: padrões pré-cortados + coloridos. (Cada pasta e cada transferência é identificada por um número de série único)	Nitrocelulose sensibilizada. Peso molecular colorido (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15, Amarelo: 10.
R2	1	Frasco de 30 (<i>30</i> , 125) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R3	1	Frasco(s) de 30 (<i>30</i> , 2x60) ml de CONJUGADO ANTI IgG (Pronto a utilizar - solução azul).	Tampão + conjugado de soro de cabra policlonal anti-IgG humana com fosfatase alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.
R5	1	Frasco de 30 (<i>30</i> , 125) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (<i>60</i> , 250) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (<u>A diluir 10 vezes</u> em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.
R10	1	Tubo de 100 (<i>100</i> , 2x100) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para <i>Fasciola</i> por serologia + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.

R1: A letra antes de cada número de tira é específica para o parâmetro.

R2, R3, R5 e R6 são comuns a todos os kits e possuem um número de lote único, dependendo apenas da sua data de produção. **É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.**

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

EUH 210 Ficha de segurança fornecida a pedido bem como no nosso site www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL NECESSARIO MAS NÃO DISPONIBILIZADO

- Tabuleiros de incubação multicanal em polipropileno para mini-blots (#WBPP-08 ou equivalente).
- Plataforma oscilatória para immunoblots, sistema de vácuo para líquidos (os tubos #WBPP-08 que fornecemos podem ser esvaziados por simples inversão).
- Tubos e material para recolher as amostras, cilindros graduados, contentores adaptados. Pipetas automáticas, micropipetas e pontas descartáveis (volumes de 10 µl, 1,2 ml e 2 ml).
- Água destilada ou desionizada. Papel absorvente (por ex. papel de filtro Whatman), fita adesiva transparente.
- Luvas, pinça para manipular as tiras, cortador ou bisturi, régua plana transparente.

Nota: Os nossos reagentes podem ser utilizados num processador automático de immunoblots. **Devem tomar-se precauções relativamente a possíveis contaminações químicas dos nossos reagentes se o processador for partilhado com reagentes de outro fabricante** (exemplo conhecido: contaminação por TWEEN 20) e a possíveis contaminações bacterianas. Frascos de reserva para o processador. Depois do processamento, não voltar colocar os restos de reagentes utilizados nos frascos originais.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conservar entre 2 e 8 °C. Os reagentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na embalagem exterior e nos rótulos dos frascos. Não use reagente contaminado ou turvo. O tampão de lavagem diluído a 1:10 é estável durante 2 meses a +2 a +8 °C e uma semana à temperatura ambiente.

CUIDADOS NA UTILIZAÇÃO

Segurança

- Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para uso profissional. Apenas para pessoal treinado tecnicamente. Manusear de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais e considerar todos os reagentes e todas as amostras como potencialmente tóxicos e/ou infecciosos.
- Usar bata, luvas e óculos: não beber, comer ou fumar no laboratório. Não pipetar com a boca.
- O controle positivo é um soro de origem humana que foi inativado para os vírus HIV 1 e 2, hepatite B e hepatite C. Contudo, deve ser manuseado como um produto potencialmente infeccioso.
- O substrato contém uma mistura de NBT e BCIP, tóxica por contacto (pele e mucosas) e por inalação.
- Os reagentes contêm azida de sódio, que pode formar sais metálicos explosivos com o chumbo e o cobre. Enxaguar qualquer derrame com água.
- Eliminar os resíduos (amostras, pontas, tubos, líquido de lavagem, reagentes usados, ...) de acordo com as boas práticas utilizadas na indústria e as regulamentações atuais do país.
- Qualquer incidente grave deve ser objeto de declaração ao fabricante e às autoridades competentes.

Cuidados

- Leia e interprete os resultados sob luz branca direta.
- É preferível utilizar todos os reagentes de um mesmo lote. Se forem utilizados lotes diferentes, assegurar a rastreabilidade.
- Utilizar as tiras por ordem numérica. Não misturar tiras com diferentes números de série; utilizar as transferências em sequência. Estabelecer um plano de distribuição específico antes de iniciar o teste.
- Não tocar nas tiras com os dedos; utilizar uma pinça.
- Os reagentes devem ser bem misturados antes da utilização, em especial o tampão de lavagem concentrado.
- Fechar os frascos após a utilização; não utilizar se tiver ocorrido introdução acidental de uma substância nos reagentes. Não utilizar reagente de um frasco que apresente sinais de vazamento. Não utilizar soluções turvas ou precipitadas.
- Utilizar apenas pontas de pipeta descartáveis. Evitar qualquer contaminação entre canais. Ter atenção à formação de espuma ou bolhas nas pontas de pipeta (contaminação bacteriana dos frascos de reagentes).
- Lavar os tabuleiros de incubação apenas com água limpa seguida de água destilada (nunca utilizar detergente ou lixívia).
- A omissão de uma amostra ou a distribuição de um volume inadequado pode tornar o teste negativo ou positivo, independentemente do seu verdadeiro estado.

RECOLHA DE AMOSTRAS

Colher as amostras em tubos secos, de forma asséptica. É necessário um mínimo de 10 µl de soro.

Manter as amostras a 2 a 8 °C até serem processadas. Se for necessário armazená-las por mais de uma semana, congelar as amostras a -20 ± 5 °C. Não utilizar uma amostra contaminada. Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente.

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem: Para 4 testes, num frasco limpo, diluir 10 ml de concentrado de lavagem 10x (R6) em 90 ml de água destilada ou desionizada. Tenha o cuidado de misturar bem o tampão diluído.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Nota importante: É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.

1. Preparar o plano de distribuição das amostras e do controlo positivo C+ (R10).

O teste só pode ser tecnicamente validado e a identificação feita, para um determinado número de série, ou reveladas as bandas específicas, através da utilização deste controlo. Uma tira C+ não pode ser usada para interpretar os resultados das tiras de um blot com um número de série diferente.

2. Cortar o número necessário de tiras (R1) utilizando um bisturi e uma régua plana transparente limpa e seca, mantendo a linha azul de posicionamento nas tiras: manter as tiras firmemente no seu lugar com a régua e cortá-las pelo lado da tensão (os números são visíveis através da régua).
3. Distribuir 1,2 ml de tampão da amostra (R2) em cada canal, de acordo com o plano estabelecido.
4. Deixe as tiras se reidratarem na superfície do tampão por aproximadamente 2 minutos, com o número visível no topo, ENTÃO, agite suavemente a bandeja para mergulhá-las totalmente no tampão
5. Distribuir as amostras e controlo(s) positivo(s): de acordo com o plano de distribuição, a uma taxa de 10 µl por canal. Agitar suavemente o tabuleiro após cada dispensa. Colocar o tabuleiro numa plataforma oscilatória. **Incubar durante 90 min.** ± 5 min. a 20 a 26 °C.
6. Passo de lavagem: Esvaziar o conteúdo dos canais com uma pipeta de Pasteur ou voltando o tabuleiro de incubação ao contrário. Verter 2 a 3 ml de tampão de lavagem diluído em cada canal. Incubar na plataforma oscilatória durante 3 min. Repetir duas vezes e, em seguida, esvaziar o conteúdo dos canais. Assegurar que as tiras não se voltam durante estes passos.
7. Verter 1,2 ml de conjugado anti IgG (R3) em cada canal. Colocar o tabuleiro na plataforma oscilatória. **Incubar durante 60 min.** ± 5 min. a 20 a 26 °C.
8. Passo de lavagem: repetir o passo 6.
9. Deitar 1,2 ml de substrato NBT/BCIP (R5) em cada um dos canais. Colocar na plataforma oscilatória e proteger da luz direta. **Incubar durante 60 min.** ± 5 min. a 20 a 26 °C.

Independentemente do parâmetro, monitorizar a revelação da cor. A revelação pode ser interrompida se a cor de fundo da tira escurecer de tal modo que a leitura seja difícil (a qualidade dos passos de lavagens possui uma influência fundamental na cor de fundo). Ter em atenção que as tiras ficarão mais claras quando secas.

10. Interromper a reação, aspirando o substrato com uma pipeta de Pasteur ou voltando a tina de incubação ao contrário e deitando 2 ml de água destilada nos canais. Repetir este último passo de lavagem mais uma vez.
11. Secagem das tiras: Com os canais ainda cheios de água, pegar nas tiras pela extremidade numerada utilizando uma pinça e depositá-las, com o número visível, sobre um papel absorvente de Whatman. Deixar secar ao ar. A cor das tiras aclarará naturalmente enquanto secam. A interpretação só deve ser feita depois de concluída a secagem.
12. Conservação: Transferir as tiras para uma folha de papel, que será utilizada para as arquivar. Alinhar as linhas de posicionamento. Mantendo-as no lugar com a régua plana, colar a extremidade superior das tiras com a fita adesiva transparente.

Para uma boa interpretação, as tiras deve ser ordenadas por transferência e pela sua ordem numérica, espaçadas com um máximo de alguns milímetros entre si. Não é fiável comparar tiras que estejam muito afastadas (por ex. a nº 2 com a nº 15). **É perigoso** (resultados falsos) comparar tiras de diferentes kits (tiras com números de série diferentes).

CONTROLO DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO

O controlo do soro (R10) disponibilizado com o kit deve ser sistematicamente incluído em qualquer série de immunoblot. Ele mostra o perfil típico e permite a validação técnica da boa execução do teste (as bandas devem aparecer muito distintamente na tira) e calibrar exatamente a posição e aspeto das bandas específicas de modo a permitir a interpretação dos resultados das tiras da mesma transferência (mesmo número de série).

Nota Bene: O perfil de controle positivo (R10) pode variar de acordo com o número de lote dos reagentes utilizados. As imagens correspondentes estão disponíveis no nosso website www.ldbiodiagnostics.com como exemplo.

Descrição das bandas

Uma amostra positiva pode apresentar diversas bandas situadas entre 120 e 7 kDa.

Entre as bandas mais ou menos marcadas que podemos encontrar nesta zona, 3 de entre elas foram especialmente retidas pela sua especificidade, a sua sensibilidade e a sua facilidade de leitura: Uma dupla em 8-9 kDa, uma banda larga em 28 kDa (frequentemente associada a uma banda fina em 25 kDa) e uma banda larga em 42 kDa. São, assim, denominadas: **P8-9**, **P28**, e **P42**.

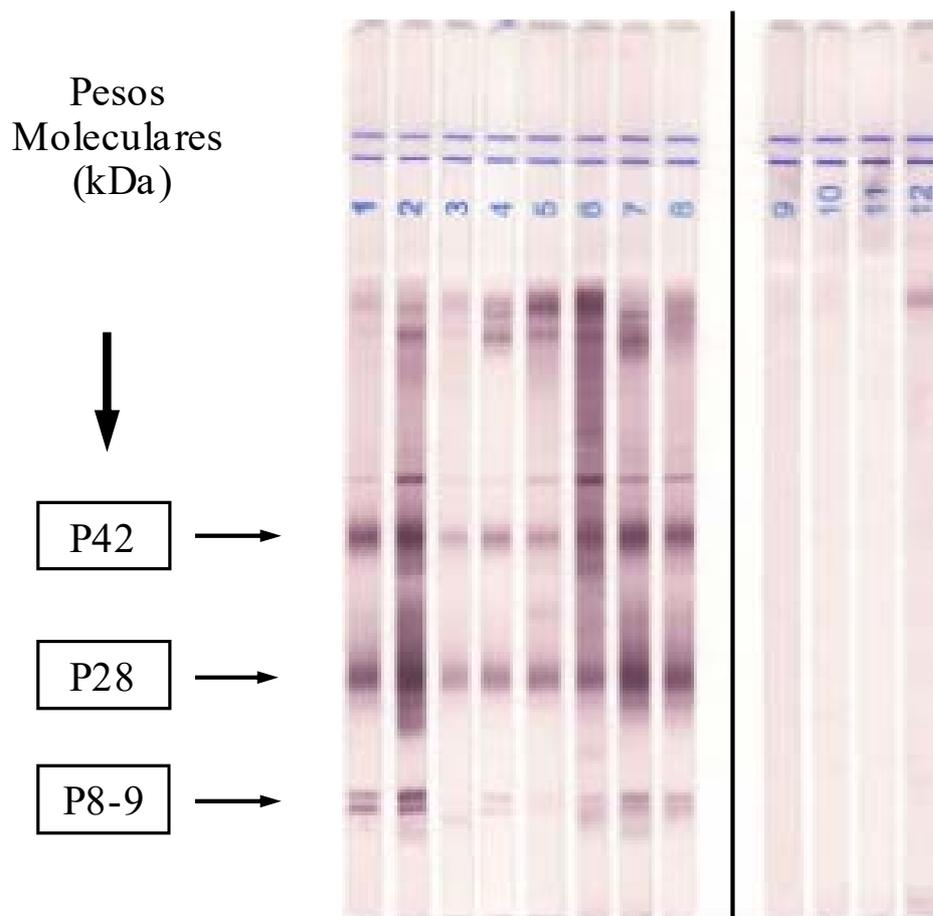


Fig. 1: Exemplos de resultados positivos e negativos

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "H" específica do parâmetro do lote "07012".

Interpretação

A presença simultânea de duas bandas entre as bandas **P8-9, P28, P42** e incluindo **P28** é indicativa de uma distomatose.
As tiras “POSITIVOS” acima mostram diferentes exemplos de perfis específicos encontrados.

Para validar os resultados, compare sempre o perfil do immunoblot de cada amostra com o do controlo positivo R10. O aspeto das bandas é importante para a interpretação do teste.

LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- O diagnóstico de uma doença infecciosa não pode ser estabelecido com base em um único resultado de teste.
- Os resultados serológicos devem ser interpretados de acordo com as informações disponíveis (por exemplo, epidemiologia, clínica, imagem, biologia, etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico. Não devem ser utilizados como base para o diagnóstico apenas com base na sua positividade.

DESEMPENHOS (ver referências bibliográficas)

A avaliação dos desempenhos do estojo **FASCIOLA ES WB IgG** (*Trichinella spiralis* -Antigénio ES) foi realizada em comparação com a versão do kit LDBIO Diagnostics FASCIOLA WB IgG - **Antigénio Total**) designado abaixo: WB REFERENCE comercializada desde 2004.

Sensibilidade

A amostra estudada corresponde a 75 soros de doentes com suspeita de triquinose clínica. Estes 75 soros foram testados paralelamente com as técnicas **FASCIOLA ES WB IgG** e **WB REFERENCE**.

n=75	WB REFERENCE	FAS ES WB IgG
POSITIF	75	75
NEGATIF	0	0

Tabela 1: Correlação **FASCIOLA ES WB IgG** / **WB REFERENCE**. A correlação é excelente (Se=100%)

Nature des bandes spécifiques (Kda)	P8-9	P28	P42
Fréquence %	65.3	100.0	100.0

Tabela 2: Frequência da presença de cada uma das bandas específicas observadas nos immunoblots durante o nosso estudo em 75 amostras positivas.

Especificidade

151 soros provenientes de infeções por parasitas e por fungos, de doenças autoimunes foram testados e de dadores de sangue em **FASCIOLA ES WB IgG**: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cysticercosis) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma* spp (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malária (7), *Candida* spp (7), Fator reumatóide RF+ (7), Anticorpos anti-nucleares ANA+ (7), dadores de sangue (53).

A especificidade das bandas P8-9, P28 e P42 do antigénio ES é de 100%. As bandas fora desta gama não são consideradas específicas.

Conclusão

A correspondência entre as duas técnicas é perfeita.

Em comparação com a referência WB, o kit **FASCIOLA ES WB IgG** deu as seguintes performances:

Se = 100% [IC95 93,9 - 100%]

Sp = 100% [IC95 96,9 - 100%]

Os intervalos de confiança são calculados de acordo com o método de Wilson com correção de continuidade.

Reprodutibilidade

Foi testada a reprodutibilidade inter-série e inter-lote. Em ambos os casos, a correlação soro a soro relativamente às bandas específicas é excelente.

Interferências

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

"As bandas estão pálidas, com pouco contraste": Certos soros com baixas concentrações de anticorpos podem dar este tipo de resultados.

"São visíveis áreas sombreadas, mais ou menos coloridas, ligeiramente difusas": A tira não foi totalmente mergulhada num dos reagentes e não incubou corretamente ao longo de todo o seu comprimento. Também podem ocorrer manchas nos locais onde a amostra foi depositada se o tabuleiro não tiver sido agitado após a distribuição.

"O ruído de fundo é significativo, tornando a leitura muito difícil": As lavagens foram insuficientes ou a última incubação foi demasiado longa. Assegurar boas técnicas de desempenho do teste, respeitar os tempos de lavagem e assegurar a boa qualidade da água. Reduzir o tempo da última incubação.

Excepcionalmente, alguns soros poderão reagir de modo inespecífico. Neste caso, o resultado do immunoblot não pode ser utilizado.

Este ruído de fundo inespecífico pode envolver apenas parte da tira, invalidando a interpretação dos resultados apenas para aquela porção.

"Aparece um precipitado na solução durante o último passo da revelação": o substrato pode, efetivamente, precipitar parcialmente (flocos pretos) no tampão no final da revelação. Este fenómeno não altera a qualidade da revelação, que deve ser continuada normalmente. A última lavagem com água destilada elimina as eventuais partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFIA

Agnamey, P, E Fortes-Lopes, C P Raccurt, J Boncy, et A Totet. 2012. « Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in haiti ». *Journal of parasitology research* 2012: 751951. doi:10.1155/2012/751951.

Arafa, M. S., S. M. Abaza, K. A. El-Shewy, E. W. Mohareb, et A. A. El-Moamly. 1999. « Detection of Fasciola-Specific Excretory/ Secretory (E/S) Protein Fraction Band (49.5 kDa) and Its Utilization in Diagnosis of Early Fascioliasis Using Different Diagnostic Techniques ». *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 29 (3): 911-26.

Hotez, Peter J., Lorenzo Savioli, et Alan Fenwick. 2012. « Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (2): e1475. doi:10.1371/journal.pntd.0001475.

- Khan, Muhammad Kasib, Muhammad Sohail Sajid, Hasan Riaz, Nazia Ehsan Ahmad, Lan He, Muhammad Shahzad, Altaf Hussain, Muhammad Nisar Khan, Zafar Iqbal, et Junlong Zhao. 2013. « The Global Burden of Fasciolosis in Domestic Animals with an Outlook on the Contribution of New Approaches for Diagnosis and Control ». *Parasitology Research* 112 (7): 2421-30. doi:10.1007/s00436-013-3464-6.
- Mera y Sierra, Roberto, Veronica H. Agramunt, Pablo Cuervo, et Santiago Mas-Coma. 2011. « Human Fascioliasis in Argentina: Retrospective Overview, Critical Analysis and Baseline for Future Research ». *Parasites & Vectors* 4: 104. doi:10.1186/1756-3305-4-104.
- Rondelaud, D., G. Dreyfuss, B. Bouteille, et M. L. Dardé. 2000. « Changes in Human Fasciolosis in a Temperate Area: About Some Observations over a 28-Year Period in Central France ». *Parasitology Research* 86 (9): 753-57.
- Salimi-Bejestani, M.R., J.W. McGarry, S. Felstead, P. Ortiz, A. Akca, et D.J.L. Williams. 2005. « Development of an Antibody-Detection ELISA for Fasciola Hepatica and Its Evaluation against a Commercially Available Test ». *Research in Veterinary Science* 78 (2): 177-81. doi:10.1016/j.rvsc.2004.08.005.
- Youssef, Ahmed I., et Shoji Uga. 2014. « Review of Parasitic Zoonoses in Egypt ». *Tropical Medicine and Health* 42 (1): 3-14. doi:10.2149/tmh.2013-23.

NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
11/08/2021	Vs 17	Remoção do aviso de segurança R5 - Endereço de e-mail de contacto - NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs18	Novo endereço
16/01/2023	Vs19	R6 sem NaN3. Tira identificada pela letra. Possível utilização de reagentes de diferentes lotes.



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