

PEO

CE



Western Blot IgG

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

#PEO-WB24G : 24 testes

#PEO-WB12G : 12 testes

#PEO-WB96G : 96 testes

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

www.ldbiodiagnostics.com

Utilização pretendida

PEO Western Blot (WB) IgG é um teste qualitativo de uso único de diagnóstico serológico de IgG por immunoblot para a doença pulmonar de criador de aves (BBD), alveolite alérgica extrínseca (EAA) com antígenos de aves, concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste.

Princípio do teste

Técnica de Western Blot

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

Reagentes fornecidos

Padrão: embalagem de 24 testes (#PEO-WB24G)

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

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (12, 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 (30, 125) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 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 (30, 125) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (A diluir 10 vezes em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante
R10	1	Tubo de 100 (100, 2x100) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para BBD por serologia + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.

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 Diagnostics) 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 necessário 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 usar todos os reagentes do mesmo lote. Se forem usados lotes diferentes, garanta 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 assética. 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, ictérico 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. \pm 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 mostrar muitas bandas entre 25 e 200 kilodaltons (kDa). Vários deles foram selecionados por sua especificidade, sensibilidade e facilidade de leitura:

- Uma banda larga a 25 kDa: P25
- Um conjunto de bandas entre 40 e 80 kDa incluindo uma banda dupla em 40kDa e uma banda larga em 80kDa: P40-80
- Uma banda larga a 120 kDa: P120.

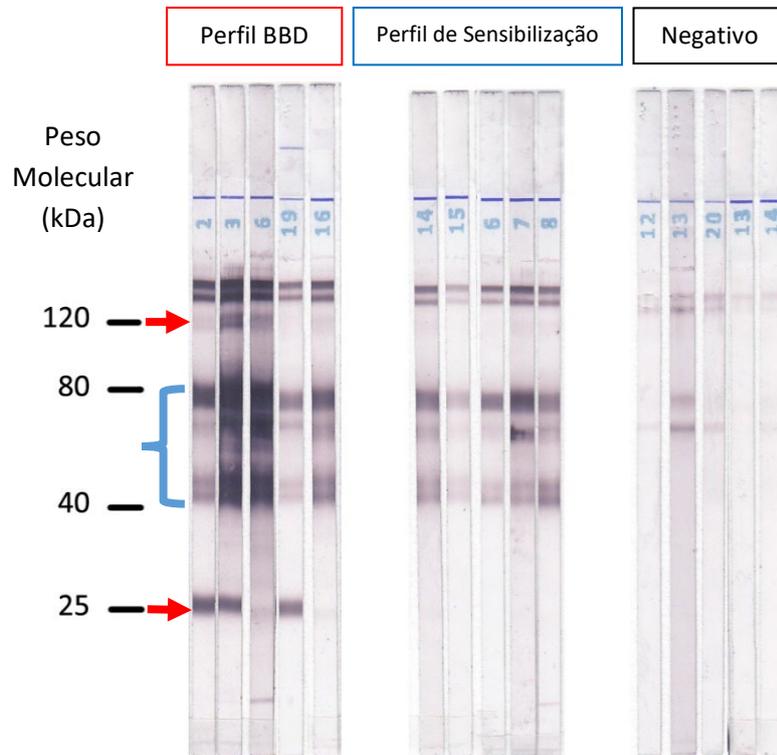


Fig. 1: Exemplos de perfis BBD, perfis de sensibilização e negativos

Os perfis são dados como exemplos. **As faixas são marcadas com a letra "L" específica para o parâmetro.**

Interpretação

- A presença simultânea das bandas **P40-80 e P25 ou P120** é indicativa de doença pulmonar do criador de aves.
- A presença simultânea das bandas **P40-80** é indicativa de **sensibilização**.

A figura 1 mostra diferentes exemplos de perfis específicos encontrados.

Para validar os resultados, compare sempre o perfil do imunoblot de cada amostra com o do controle 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

A avaliação incluiu dois grupos complementares de pacientes:

- Um grupo prospectivo de 185 soros caracterizados por uma técnica de rastreio automatizada num laboratório de biologia especializado e cujos resultados positivos foram enviados para confirmação num laboratório de referência para diagnóstico de doença pulmonar de criador de aves (16 BBD, 5 sensibilizados, 164 negativos).

- Um grupo complementar de 63 soros caracterizados do mesmo laboratório de referência (38 BBD, 10 sensibilizados, 15 negativos).

O objetivo da avaliação foi determinar o desempenho do WB em pacientes com BBD e a capacidade de discriminar entre BBD e outros pacientes. Os intervalos de confiança são calculados de acordo com o método de Wilson com correção para continuidade

<i>Pacientes</i>	Perfis de PEO WB IgG N=248		
	BBD	Sensibilizado	Neg
<i>BBD</i> N=54	45	7	2
<i>Sensibilizado</i> N=15	2	2	11
<i>Negativo</i> N=179	15	23	141

A presença das bandas P40-80 (perfil BBD + perfil sensibilizado) permitiu a deteção de 56/69 amostras positivas incluindo 52/54 EAA, sendo negativa para 141/179 amostras negativas. A sensibilidade é, portanto, 81,2% (IC95 [69,6-89,2%]) para todos os positivos e 96,3% (IC95 [86,1-99,4%]) para pacientes com BBD. A especificidade foi de 78,8% (IC95 [71,9-84,4%]).

O perfil BBD permitiu a identificação correta de 45/54 pacientes com BBD, e permitiu a exclusão de 177/194 das demais amostras. A sensibilidade foi, portanto, de 83,3% (IC95 [70,2-91,6%]) e a especificidade de 91,2% (IC95 [86,1-94,7%]).

Esses desempenhos permitem o uso de PEO WB IgG como um teste de segunda linha para a confirmação de casos suspeitos de doença de criador de aves (BBD).

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 imunoblot 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

Goudswaard J, Noordzij A, Stam JW. Pigeon IgA: a major antigen in pigeon breeder's disease. Immunol Commun. 1978;7(6):661–8.

McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol. 2000 Sep;30(9):1221–9.

Chan AL, Juarez MM, Leslie KO, Ismail HA, Albertson TE. Bird fancier's lung: a state-of-the-art review. Clin Rev Allergy Immunol. 2012 Aug;43(1-2):69–83.

Nademi Z, Todryk S, Baldwin C. Characteristics of antibody responses in Pigeon Fanciers' Lung. Mol Immunol. 2013 Jun;54(2):227–32.

Ohtani Y, Hisauchi K, Sumi Y, Miyashita Y, Sawada M, Miyake S, et al. Sequential changes in bronchoalveolar lavage cells and cytokines in a patient progressing from acute to chronic bird Fancier's lung disease. Intern Med Tokyo Jpn. 1999 Nov;38(11):896–9.

Toubas D, Aubert D, Villena I, Foudrinier F, Chemla C, Pinon JM. Use of co-immunoelectrodiffusion to detect presumed disease-associated precipitating antibodies, and time-course value of specific isotypes in bird-breeder's disease. J Immunol Methods. 2003 Jan 15;272(1-2):135–45.

Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. Chest. 2012 Jul;142(1):208–17.

NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
13/05/2022	Vs 01	conceção
10/08/2022	Vs 02	R6 sem NaN3. Strip identificada por letra A. Possibilidade de usar reagentes de lotes diferentes.
30/11/2022	Vs03	Nova morada
16/06/2023	Vs04	Correção: Faixa identificada pela letra L



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