

# TOXOCARA

CE



## Western Blot IgG

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

#TXA-WB24G : 24 testes

#TXA-WB12G : 12 testes

#TXA-WB96G : 96 testes

## INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

[www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## Utilização pretendida

**TOXOCARA Western Blot (WB) IgG** é um teste qualitativo de uso único diagnóstico serológico de IgG por immunoblot para a toxocaríase, concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste. Pode ser efetuado em soro, líquido cefalorraquidiano (LCR) ou humor aquoso.

## Princípio do teste

### Técnica de Western Blot

Os antígenos excretores/secretores (ES) de *Toxocara canis*, uma vez separados por eletroforese, são ligados por electrobloeting 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 (ou LCR/humor aquoso) a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos anti-*Toxocara* potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antígenos ES de *T. canis*. O conjugado fosfatase alcalina-anti IgG humana liga-se então aos anticorpos anti-*Toxocara*. Por fim, os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Toxocara* do tipo IgG presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

## Reagentes fornecidos

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

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

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (12, <b>4x24</b> ) 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.
R2	1	Frasco de 30 (30, <b>125</b> ) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, <b>2x60</b> ) 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, <b>125</b> ) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (60, <b>250</b> ) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (A diluir 10 vezes em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.
R10	1	Tubo de 100 (100, <b>2x100</b> ) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para <i>Toxocara</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 Diagnostics) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.**

**R10** é calibrado em imunoblot de acordo com um lote de referência e é dedicado apenas a esta técnica.

R3, R10 (NaN<sub>3</sub>): 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](http://www.ldbiodiagnostics.com).

## Material necessário mas não disponibilizado

- Tabuleiros de incubação multicanal em polipropileno para mini-blots (#WBPP-08 ou equivalente).
- Plataforma oscilatória para imunoblots, 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, 25µl, 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 imunoblots. **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 assética. É necessário um mínimo de 10 µl de soro, de humor aquoso ou LCR. Nos casos de humor aquoso ou LCR, o uso de 25 µl aumentará a sensibilidade do teste.

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  $-20 \pm 5$  °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 (de preferência 25 µl para humor aquoso ou LCR). 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

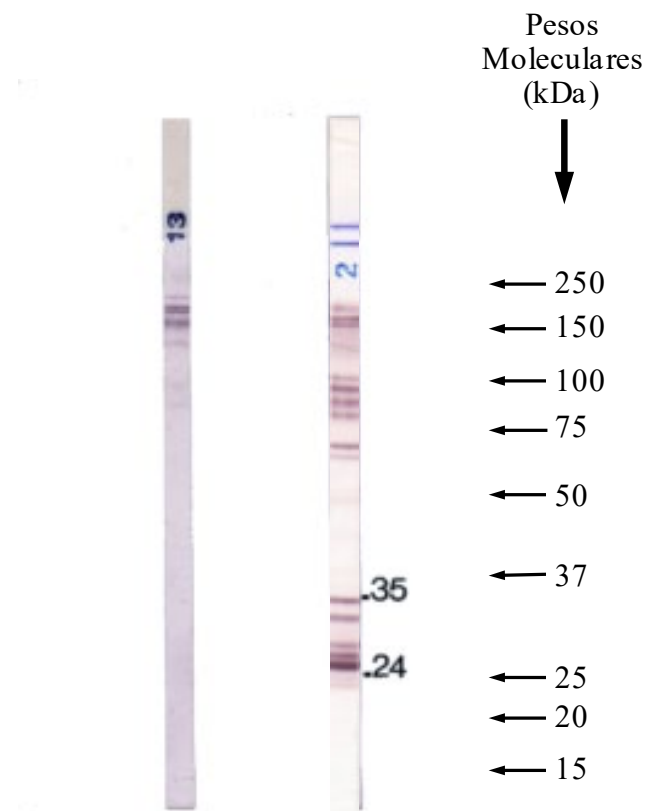
O controlo do soro (R10) disponibilizado com o kit deve ser sistematicamente incluído em qualquer série de immunoblot. Ele mostra o perfil típico e permite a validação técnica da boa execução do teste (as bandas devem aparecer muito distintamente na tira) e calibrar exatamente a posição e aspeto das 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](http://www.ldbiodiagnostics.com) como exemplo.

### Descrição das bandas

Uma amostra positiva pode apresentar múltiplas bandas entre 15 e 200 quilodaltons (kDa). Procure as bandas de baixo peso molecular (BPM), 24 a 35 kDa, para cada uma das amostras testadas utilizando as ferramentas de identificação descritas em cima. Estas bandas, agrupadas e bem isoladas, são características e geralmente fáceis de encontrar.

Na gama dos 70 a 90 kDa e 100 a 200 kDa podem ser observados dois grupos de bandas de alto peso molecular (APM). Estas bandas não são específicas da toxocaríase: possível reação cruzada com outra helmintíase.



**Fig. 1:** Exemplos de resultados positivos e negativos

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "B" específica do parâmetro do lote "01010".

### Interpretação

A presença **simultânea** de duas bandas entre 24 e 35 kDa é indicativa da presença de anticorpos específicos anti-*Toxocara*.

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)

O teste **Toxocara WB IgG** foi alvo de um estudo comparativo com o imunoblot de referência do Toulouse CHU (Centro Hospitalar Universitário). Os critérios de interpretação e o desempenho de ambos os testes são estreitamente comparáveis.

### Sensibilidade

Os dados da literatura descrevem uma excelente sensibilidade do teste **Toxocara WB IgG**, com frequência significativamente superiores à dos testes de despiste de ES por ELISA, confirmando o lugar do imunoblot enquanto técnica de diagnóstico e confirmação.

Nota: O valor numérico da sensibilidade não pode ser calculado devido à ausência de um método diagnóstico de referência.

### Especificidade

A especificidade das bandas 24-35 do antígeno ES é de 100%. As bandas fora desta gama não são consideradas específicas.

### 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.

Exceionalmente, 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

- C. N. L. Macpherson, « The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance », *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, nº 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, nº 8, p. 697-702, 1991.
- J. Fillaux et J.-F. Magnaval, « Laboratory diagnosis of human toxocariasis », *Vet. Parasitol.*, vol. 193, nº 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, nº 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, nº 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, nº 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, nº 3, p. 137, 2004.

### NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
28/07/2021	Vs 14	Remoção do aviso de segurança R5 - Endereço de e-mail de contacto – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Novo endereço.
21/12/2022	Vs16	R6 sem NaN3. Tira identificada pela letra B. Possível utilização de reagentes de diferentes lotes.



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