

TOXOCARA

CE



Western Blot IgG

Test *in vitro* Test imunoblot
Tehnica semi-automată / manuală

#TXA-WB24G : 24 teste

#TXA-WB12G : 12 teste

#TXA-WB96G : 96 teste

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Găsiți mai multe informații și instrucțiuni de utilizare în limba dvs. pe site-ul nostru

www.ldbiodiagnostics.com

Utilizare prevăzută

TOXOCARA Western Blot (WB) IgG este un test calitativ de o singură utilizare de diagnostic IgG serologic prin testul imunoblot de toxocarioză destinat testelor de confirmare a unui rezultat pozitiv sau echivoc obținut prin teste clasice de screening. Se poate efectua pe seruri, lichidul cefalorahidian (CSF) sau umoarea apoasă.

Principiul testului

Tehnica Western Blot

Antigenele excretoare/secretoare (ES) din *Toxocara canis*, odată separate prin electroforeză, se leagă prin electroblotting la suprafața unei membrane de nitroceluloză (numită transfer) tăiată în 24 de strip-uri numerotate de la 1 la 24.

Efectuarea testului

Fiecare specimen care urmează să fie testat este incubat separat cu un strip. Anticorpilor specifici care pot fi prezenți în probă se leagă selectiv de antigene. Conjugatul IgG alcalin uman anti-fosfatază se leagă apoi la anticorpilor legați. În cele din urmă, imuno-complexurile reacționează cu substratul. Antigenele recunoscute de anticorpilor specifici de tip IgG prezenți în probe sunt dezvăluite ca benzi transversale purpurii.

Reactivii furnizați

Implicit: pachet de 24 de teste (#TXA-WB24G)

italic: pachet de 12 teste (#TXA-WB12G) - **bold**: pachet de 96 teste (#TXA-WB96G).

ID	Cantitate	Descriere	Compoziție
R1	1	Dosar(e) de 24 (12, 4x24) STRIP-URI: Standarde pre-secționate + colorate. (Fiecare dosar și fiecare transfer se identifică printr-un număr de serie unic).	Nitroceluloză sensibilizată. Greutate moleculară colorată (kDa): Albastru: 250, Albastru: 150, Albastru: 100, Roz: 75, Albastru: 50, Verde: 37, Roz: 25, Albastru: 20, Albastru: 15.
R2	1	Flacoane de 30 (30, 125) ml de SOLUȚIE-TAMPON PENTRU PROBE (Gata de utilizare - soluție roz).	Soluție-tampon + surfactant.
R3	1	Flacoane de 30 (30, 2x60) ml de CONJUGAT ANTI IgG (Gata de utilizare – soluție albastră).	Soluție-tampon + seruri policlonale de capră IgG anti-umane conjugate cu fosfatază alcalină + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.
R5	1	Flacoane de 30 (30, 125) ml de SUBSTRAT (Gata de utilizare – flacon maro opac).	Soluție-tampon + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Flacoane de 60 (60, 250) ml de SOLUȚIE-TAMPON DE SPĂLARE CONCENTRATĂ 10X (Se diluează de 10 ori în apă distilată - soluție incoloră).	Soluție-tampon + surfactant.
R10	1	Tub de 100 (100, 2x100) μl de MARTOR SERIC POZITIV (Gata de utilizare - capac roșu).	Soluție-tampon + baie de ser pozitiv uman în serologie <i>Toxacara</i> + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizatori.

R1: Litera de dinaintea fiecărui număr de bandă este specifică parametrului.

R2, R3, R5 și R6 sunt comune tuturor kiturilor LDBIO Diagnostics și au un număr de lot unic, în funcție de data producerii lor. Se recomandă efectuarea testelor multiparametrice (a se vedea gama imunoblot LDBIO Diagnostics) pentru a limita numărul de flacoane deschise și pentru a asigura un control mai bun al calității.

R10 este calibrat în imunoblot conform unui lot de referință și este dedicat doar acestei tehnici.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic.

EUH 210 Fișa cu date de securitate disponibilă la cerere și pe site-ul nostru web www.ldbiodiagnostics.com.

R10 este calibrat în imunoblot conform unui lot de referință și este dedicat doar acestei tehnici.

Material necesar, dar nefurnizat

- Tăvi de incubație cu canale multiple din polipropilenă pentru mini-bloturi (# WBPP-08 sau echivalent).
- Agitator oscilant pentru imunoblot, sistem de vid pentru lichide (tuburile # WBPP-08 pe care le furnizăm pot fi golite prin simpla rotire a acestora).
- Tuburi și materiale pentru extragerea probelor, cilindri gradați, recipiente adaptate.
- Pipete automate, micropipete și vârfuri de unică folosință (volume de 10 µl, 25 µl, 1,2 ml și 2 ml).
- Apă distilată sau deionizată. Hârtie absorbantă (de exemplu, hârtie de filtru Whatman), bandă adezivă transparentă.
- Mănuși, pensete pentru a manipula strip-urile, cutter sau bisturiu, riglă transparentă.

Notă: Reactivii noștri pot fi utilizați într-un procesor imunoblot automatizat. **Trebuie să aveți grijă cu eventualele contaminări chimice ale reactivilor noștri, dacă procesorul este împărțit cu reactivi de la un alt producător** (exemplu cunoscut: contaminarea cu TWEEN 20) și contaminări bacteriene. Rezervați flacoanele pentru procesor. După procesare, nu puneți reactivii rămași înapoi în flacoanele originale.

Depozitare și stabilitate

A se păstra între 2 și 8°C. Reactivii din kit sunt stabili până la data de expirare indicată pe cutia exterioară și etichetele flaconului. Nu utilizați reactiv contaminat sau turbure. Soluția-tampon de spălare diluat la 1/10 este stabilă timp de 2 luni la +2 până la + 8 °C și o săptămână la temperatura camerei.

Precauțiuni de utilizare

Siguranță

- Numai pentru utilizare *in vitro*. Numai pentru uz profesional. Numai pentru personalul instruit tehnic. Manipulați în conformitate cu Bunele Practici de Laborator și considerați orice reactiv și orice probă ca având potențial toxic și/ sau infecțios.
- Purtați un halat de laborator, mănuși și ochelari; nu beți, nu mâncați sau nu fumați în laborator. Nu atingeți cu gura pipetele.
- Controlul pozitiv este un ser de origine umană care a fost inactivat pentru virusurile HIV 1 și 2, hepatita B și hepatita C. Cu toate acestea, trebuie tratat ca un produs cu potențial infecțios.
- Substratul conține un amestec de NBT și BCIP, toxic la contact (piele și mucoase) și inhalare.
- Reactivii conțin azidă de sodiu, care poate forma săruri metalice explozive cu plumb și cupru. Clătiți cu apă orice scurgere.
- Evacuați deșeurile (probe, vârfuri, tuburi, lichid de spălare, reactiv utilizat ...) în conformitate cu bunele practici utilizate în domeniu și reglementările actuale din țară.
- Orice incident grav trebuie să facă obiectul unei declarații către producător și autoritatea competentă.

Măsurile de precauție

- Citiți și interpretați rezultatele sub lumină albă directă.
- Este preferabil să se utilizeze toți reactivii din același lot. În cazul în care se utilizează loturi diferite, asigurați trasabilitatea.
- Utilizați benzile în ordine numerică. Nu amestecați benzi din numere de serie diferite; utilizați transferurile succesiv. Stabiliți un plan de distribuție specific înainte de a începe testul.
- Nu atingeți benzile cu degetele; utilizați pensete.
- Reactivii trebuie amestecați bine înainte de utilizare, în special soluția-tampon de spălare concentrată.
- Închideți flacoanele după utilizare; nu utilizați dacă o substanță a fost introdusă accidental în reactivi. Nu utilizați reactivul dintr-un flacon care prezintă semne de scurgere. Nu utilizați soluție turbidă sau precipitată.
- Utilizați doar vârfuri de pipetă de unică folosință. Evitați orice contaminare intra-canal. Urmăriți formarea de spumă sau bule în vârfurile pipetelor (contaminarea bacteriană a flacoanelor cu reactiv).
- Curățați tăvile de incubare numai cu apă distilată (nu folosiți niciodată detergent sau înălbitor).
- Omiterea unei probe sau distribuirea unui volum necorespunzător poate face ca rezultatul testului să fie negativ sau pozitiv, indiferent de starea reală a acestuia.

Colectarea specimenelor

Se colectează aseptice probele în tuburi uscate. Este necesar un minim de 10 μl de ser, umoare apoasă sau CSF. În cazul umorii apoase sau CSF, utilizarea a 25 μl va crește sensibilitatea testului.

Păstrați probele la 2-8 °C până când acestea sunt prelucrate. Dacă este necesar să le depozitați mai mult de o săptămână, congelați probele la -20 ± 5°C. Nu utilizați probe contaminate. Evitați înghețarea și dezghețarea probelor în mod repetat.

Chiar dacă nu s-a observat o reacție încrucișată specială cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor obținute din utilizarea acestor probe.

Prepararea reactivilor

Soluție-tampon de spălare: Pentru 4 teste, într-o sticlă curată, se diluează 10 ml de concentrat de spălare 10X (R6) în 90 ml de apă distilată sau deionizată. Aveți grijă să amestecați bine Soluție-tampon diluat.

Procedura de testare

Nota Bene: Se recomandă efectuarea testelor multiparametrice (vezi gama de imunoblot LDBIO Diagnostics) pentru a limita numărul de flacoane deschise și pentru a asigura un control mai bun al calității.

1. Pregătiți un plan de distribuție pentru probe și martor pozitiv C + (R10).

Numai prin utilizarea acestui martor, testul poate fi validat din punct de vedere tehnic și făcută identificarea, pentru un anumit număr de serie, a benzilor specifice dezvoltate. Un strip C + nu poate fi utilizat pentru interpretarea rezultatelor benzilor dintr-un blot cu un număr de serie diferit.

2. Tăiați numărul necesar de strip-uri (R1) folosind un bisturiu și o riglă transparentă, curată și uscată, păstrând linia albastră de poziționare pe strip-uri: țineți strip-urile ferm în poziție cu rigla și tăiați-le pe partea tulpinii (numerele sunt vizibile prin riglă).
3. Distribuți 1,2 ml de soluție-tampon pentru probe (R2) în fiecare canal, în conformitate cu planul stabilit.
4. Depuneți, în ordinea lor numerică, strip-urile numerotate în canale: Lăsați strip-urile să se rehidrateze la suprafață timp de aproximativ 2 minute, cu numărul vizibil în partea de sus, APOI scuturați ușor tava pentru a le scufunda complet în soluție-tampon.
5. Distribuți probele și martorul pozitiv: în conformitate cu planul de distribuție, la o rată de 10 µl pe canal (preferabil 25 µl pentru umoarea apoasă sau CSF). Scuturați ușor tava după fiecare dispersare. Așezați tava pe un agitator oscilant. **Se incubează timp de 90 min ± 5 minute la 20-26 ° C.**
6. Pasul de spălare: Goliți conținutul canalelor cu o pipetă Pasteur sau întorcând tava de incubație. Se distribuie 2 până la 3 ml de soluție-tampon de spălare diluată în fiecare canal. Incubați pe agitatorul oscilant timp de 3 minute. Repetați de 2 ori, apoi goliți conținutul canalelor. Asigurați-vă că strip-urile nu se rotesc în timpul acestor pași.
7. Distribuți 1,2 ml de conjugat anti-IgG (R3) în fiecare canal. Așezați tava pe agitatorul oscilant. **Se incubează timp de 60 min ± 5 minute la 20-26 ° C.**
8. Pasul de spălare: repetați etapa 6.
9. Distribuți 1,2 ml de substrat NBT / BCIP (R5) în fiecare dintre canale. Așezați-l pe agitatorul oscilant și protejați-l de lumina directă. **Se incubează timp de 60 min ± 5 minute la 20-26 ° C.**

Indiferent de parametru, monitorizați dezvoltarea culorii. Dezvoltarea poate fi oprită dacă culoarea de fundal a strip-ului se întunecă până la punctul în care citirea este dificilă (calitatea pașilor de spălare are o influență fundamentală asupra colorării fundalului). Rețineți că strip-urile se vor decolora pe măsură ce se usucă.

10. Opriti reacția prin aspirarea substratului cu o pipetă Pasteur sau prin rotirea tubului de incubație și distribuirea a 2 ml de apă distilată în canale. Repetați ultima etapă de spălare încă o dată.
11. Uscarea strip-urilor: Cu canalele încă pline cu apă, apucați strip-urile de capătul numerotat folosind pensetele și așezați-le, cu numărul vizibil, pe o hârtie absorbantă Whatman. Lăsați-le să se usuce la aer. Culoarea strip-urilor se va deschide în mod natural în timpul uscării. Interpretarea trebuie efectuată numai după finalizarea procesului de uscare.
12. Depozitare: transferați strip-urile pe o foaie de hârtie, care va fi utilizată pentru a le arhiva. Aliniați liniile de poziționare albastre. Păstrați-le în poziție cu rigla plată, lipiți partea superioară a strip-urilor cu bandă adezivă transparentă.

Pentru o bună interpretare, strip-urile trebuie ordonate prin transfer și în ordinea lor numerică, separate la o distanță de cel puțin câțiva milimetri. Nu este fiabilă compararea strip-urilor care au o distanță foarte mare între ele (de exemplu, nr.2 cu nr.15). **Este periculos** (rezultate false) să comparați strip-urile din kituri diferite (strip-uri cu numere de serie diferite).

Controlul calității și interpretarea

Martorul seric (R10) furnizat împreună cu kitul trebuie inclus în mod sistematic în orice serie de imunoblot. Acesta prezintă profilul tipic și permite validarea tehnică a bunei desfășurări a testului (benzile trebuie să apară foarte clar pe strip) și calibrarea precisă a poziției și aspectului benzilor specifice pentru a permite interpretarea rezultatelor benzilor de la același transfer (același număr de serie).

Nota Bene: Profilul de control pozitiv (R10) poate varia în funcție de numărul lotului de reactivi utilizați. Imaginile corespunzătoare sunt disponibile pe site-ul nostru www.ldbiodiagnostics.com ca exemplu.

Descrierea benzilor

O probă pozitivă poate prezenta numeroase benzi între 15 și 200 kilodaltoni (kDa). Căutați benzi cu greutate moleculară mică (LMW) de 24-35 kDa pentru fiecare dintre probele testate utilizând instrumentele de identificare descrise mai sus. Aceste benzi, grupate și bine izolate, sunt caracteristice și în general ușor de găsit.

Două grupe de benzi de înaltă greutate moleculară (HMW) pot fi observate în intervalul 70-90 kDa și 100-200 kDa. Aceste benzi nu sunt specifice toxocariazii: posibilă reacție încrucișată cu o altă helmintiază.

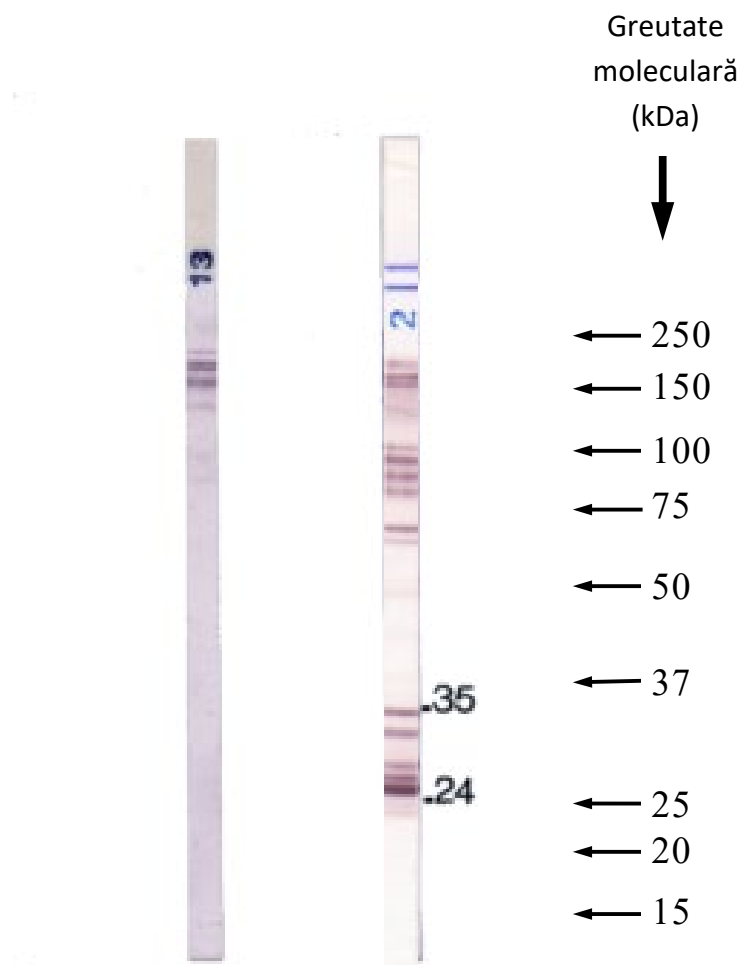


Fig. 1: Exemple de rezultate pozitive și negative

Profilurile sunt prezentate ca exemple. Benzile sunt marcate cu litera "B" specifică parametrului din lotul "01009".

Interpretare

Prezența **simultană** a 2 benzi între 24 și 35 kDa indică prezența anticorpilor specifici anti-*Toxocara*.

Pentru a valida rezultatele, comparați întotdeauna profilul de imunoblot al fiecărei probe cu cel al matorului pozitiv R10. Aspectul benzilor este important în interpretarea testului.

Limitări de utilizare

- Diagnosticul unei boli infecțioase nu poate fi stabilit pe baza unui singur rezultat al testului.
- Rezultatele serologice trebuie interpretate în funcție de informațiile disponibile (de exemplu, epidemiologie, clinică, imagistică, biologie etc.) pentru a stabili un diagnostic. Acestea nu ar trebui să fie folosite ca bază de diagnostic doar pe baza pozitivității lor.

Performanțe (vezi referințele literaturii)

Testul **Toxocara WB IgG** a fost supus unui studiu comparativ cu imunoblot-ul de referință al Spitalul Central Universitar Toulouse (France). Criteriile de interpretare și performanța celor două teste sunt foarte comparabile.

Sensibilitate

Datele din literatura de specialitate descriu o excelentă sensibilitate a testului **Toxocara WB IgG**, adesea semnificativ mai mare decât cel al testelor de screening ES ELISA, confirmând locul testului imunoblot ca tehnică de diagnosticare și confirmare.

Nota: Valoarea numerotată a sensibilității nu poate fi calculată datorită absenței unei metode de diagnosticare de referință.

Specificitate

Specificitatea benzilor 24-35 din antigenul ES este de 100%. Benzile din afara acestui interval nu sunt considerate specifice.

Reproductibilitate

S-a testat reproductibilitatea între serii și între loturi. În ambele cazuri, corelația ser cu ser în raport cu benzile specifice este excelentă.

Interferențe

Chiar dacă nu s-a observat o reacție încrucișată specială cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor obținute din utilizarea acestor probe.

Depistarea defectelor

"Benzile sunt șterse, cu un contrast mic": Anumite seruri cu concentrații scăzute de anticorpi pot genera astfel de rezultate.

"Pot fi văzute zone umbrite, mai mult sau mai puțin colorate, ușor difuze": Strip-ul nu a fost complet scufundat într-unul dintre reactivi și nu s-a incubat corect pe toată lungimea sa. Petele pot fi de asemenea prezente acolo unde proba a fost depusă dacă tava nu a fost agitată după distribuire.

"Zgomotul de fond este semnificativ, ceea ce face ca citirea să fie foarte dificilă": Spălările au fost insuficiente sau ultima incubare a fost prea lungă. Aplicați tehnici bune de testare a performanțelor, respectați timpii de spălare și asigurați calitatea apei. Reduceți timpul ultimei incubări. În mod excepțional, anumite seruri pot reacționa într-o manieră nespecifică. Apoi, rezultatul testului imunoblot nu poate fi folosit.

Acest zgomot de fond nespecific poate implica doar o parte din strip, făcând rezultatele neinterpretabile doar pentru acea parte.

"In timpul ultimei etape de dezvoltare apare un precipitat in soluție": Substratul poate, de fapt, să precipite parțial (fulgi negri) în soluție-tampon la sfârșitul dezvoltării. Acest fenomen nu modifică calitatea dezvoltării, care trebuie continuată în mod normal. Ultima spălare cu apă distilată elimină posibilele particule solide prezente.

Bibliografie

- 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.

NOTIFICARE DE ACTUALIZARE - Vă rugăm să citiți cu atenție

DATA ELIBERĂRII	VERSIUNE	REZUMATUL MODIFICĂRIILOR
28/07/2021	Vs 14	Eliminarea avertismentului de securitate R5 - Adresa de e-mail de contact – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs15	Adresă nouă.
21/12/2022	Vs16	R6 fără NaN3. Bandă identificată cu litera B. Posibilă utilizare de reactivi din loturi diferite.



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