

FASCIOLA E/S

Western blot IgG



Immunoblot-Assay für
die *In-vitro*-Diagnostik



#FAS ES-WB24G : 24 tests

#FAS ES-WB12G : 12 tests

#FAS ES-WB96G : 96 tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Verwendungszweck

FASCIOLA E/S Western blot (WB) IgG ist ein qualitativer Test der serologischen IgG-Diagnose mittels Immunoblot-Assay auf Fasziose, der als Bestätigungstest bei einem positiven oder mehrdeutigen Ergebnis in klassischen Screeningtests vorgesehen ist.

Testprinzip

Westernblot-Technik: Die exkretorischen/sekretorischen (E/S) -Antigene von *Fasciola hepatica* (*Großer Leberegel*) werden nach der Trennung durch Elektrophorese mittels Elektroblothing an die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran gebunden (Transfer genannt), die in 24 von 1 bis 24 nummerierte Streifen geschnitten wird.

Durchführung des Tests: Jede zu prüfende Serumprobe wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Fasciola*-Antikörper binden selektiv an die Antigene von *F. hepatica*. Das alkalische Phosphatase Anti-Human-IgG-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Fasciola*-Antikörper. Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Fasciola*-Antikörpern erkannten Antigene vom Typ IgG werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

Im Kit enthaltene Reagenzien

kursiv: Packung mit 12 Tests (#FAS ES-WB12G) - **fett**: Packung mit 96 Tests (#FAS ES-WB96G).

ID	Menge	Beschreibung	Zusammensetzung
R1	1	Block/Blöcke mit 24 (<i>12, 4 x 24</i>) STREIFEN: vorgeschchnittener + gefärbter Standard. (Jeder Block und jeder Transfer sind mit einer eigenen einzigartigen Seriennummer gekennzeichnet)	Sensibilisierte Nitrocellulose. Gefärbtes Molekulargewicht (kDa): Blau: 250, Blau: 150, Blau: 100, Rosa: 75, Blau: 50, Grün: 37, Rosa: 25, Blau: 20, Blau: 15, Gelb: 10.
R2	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) ml PROBENPUFFER (Gebrauchsfertig – rosafarbene Lösung).	Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %).
R3	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 2 x 60</i>) ml ANTI-IgG-KONJUGAT (Gebrauchsfertig – blaue Lösung).	Puffer + anti-humane IgG polyklonale Ziegensera konjugiert mit alkalischer Phosphatase + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren.
R5	1	Fläschchen mit 30 (<i>30, 125</i>) ml SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen).	Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren.
R6	1	Fläschchen mit 60 (<i>60, 250</i>) ml WASHKONZENTRAT 10X PUFFER (<u>Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden</u> – farblose Lösung).	Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %).
R10	1	Röhrchen mit 200 (<i>200, 2 x 200</i>) µl POSITIVEM KONTROLLSERUM (Gebrauchsfertig – rote Kappe).	Puffer + Sammelprobe von Humanseren mit positiver <i>Fasciola</i> -Serologie + NaN ₃ (< 0,1 %) + Stabilisatoren.

R2, R3, R5 und R6 sind Bestandteil aller Kits und weisen eine eigene einzigartige Chargennummer auf, die nur vom jeweiligen Produktionsdatum abhängt. Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

Zusätzlich erforderliches Material, das nicht im Lieferumfang enthalten ist

- Multikanal-Polypropylen-Inkubationswannen für Mini-Blots (#WBPP-08 oder gleichwertig).
- Wippschüttler für Immunoblots, Vakuumsystem für Flüssigkeiten (die von uns gelieferten #WBPP-08-Wannen können durch einfaches Umdrehen geleert werden).
- Röhrchen und Material zur Probenahme, Messzylinder, angepasste Behälter. Automatische Pipetten, Mikropipetten und Einwegspitzen (Mengen von 25 µl, 1,2 ml und 2 ml).
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser. Saugpapier (z. B. Whatman Filterpapier), transparentes Klebeband.
- Latexhandschuhe, Pinzetten zur Handhabung der Streifen, Cutter oder Skalpell, flaches transparentes Lineal.

Hinweis: Unsere Reagenzien können in einem automatisierten Immunoblot-Prozessor verwendet werden. **Es sollte darauf geachtet werden, dass keine chemischen Kontaminationen unserer Reagenzien auftreten, wenn im Prozessor auch Reagenzien anderer Hersteller verwendet werden** (bekanntes Beispiel: Kontamination durch TWEEN 20), und keine bakteriellen Kontaminationen. Fläschchen für den Prozessor reservieren. Nach der Verarbeitung dürfen Reste verwendeter Reagenzien nicht zurück in die Originalfläschchen gegeben werden.

Lagerung und Stabilität

Zwischen 2 und 8 °C lagern. Die Reagenzien des Kits sind bis zum auf der Außenverpackung und den Fläschchenetiketten angegebenen Ablaufdatum stabil. 1/10 verdünnter Waschpuffer bleibt bei +2 bis +8 °C zwei Monate und bei Raumtemperatur eine Woche stabil.

Warnhinweise für den Gebrauch

Sicherheit

- Nur für *In-vitro*-Anwendung. Entsprechend der Guten Laborpraxis handhaben und jedes Reagenz und jede Probe als potenziell toxisch und/oder infektiös behandeln.
- Laborkittel, Handschuhe und Brille tragen; im Labor nicht trinken, essen oder rauchen. Pipetten nicht mit dem Mund handhaben.
- Eine positive Kontrolle ist ein Serum humanen Ursprungs, das geprüft und negativ auf HIV 1- und HIV 2-Antikörper, HCV-Antikörper und HB-Antigen getestet wurde. Trotzdem muss sie wie ein potenziell infektiöses Produkt behandelt werden.
- Das Substrat enthält eine Mischung aus NBT und BCIP und wirkt bei Kontakt (Haut und Schleimhäute) und Inhalation toxisch.
- Die Reagenzien enthalten Natriumazid, das mit Blei und Kupfer explosive Metallsalze bilden kann. Verschüttungen mit Wasser reinigen.
- Abfall (Proben, Spitzen, Röhrchen, Waschflüssigkeit, gebrauchtes Reagenz...) gemäß guter Praxis der Branche und aktuellen nationalen Bestimmungen entsorgen.

Vorsichtsmaßnahmen

- Keine flüssigen Reagenzien aus verschiedenen Chargen zusammen verwenden.
- Die Streifen in numerischer Reihenfolge verwenden. Streifen mit verschiedener Seriennummer nicht mischen; die Transfers der Reihe nach verwenden. Vor Testbeginn sollte ein spezifischer Aufteilungsplan erstellt werden.
- Die Streifen nicht mit den Fingern berühren; eine Pinzette verwenden.
- Die Reagenzien müssen vor der Verwendung gut vermischt werden, insbesondere der konzentrierte Waschpuffer.
- Die Fläschchen nach der Verwendung verschließen; nicht verwenden, wenn versehentlich eine Substanz in die Reagenzien gelangt ist. Reagenzien aus Fläschchen, die Anzeichen ausgelaufenen Materials aufweisen, nicht verwenden. Trübe oder ausgefällte Lösung nicht verwenden.
- Nur Einwegpipettenspitzen verwenden. Kontamination zwischen den Kanälen vermeiden. Darauf achten, ob sich in den Pipettenspitzen Schaum oder Bläschen bilden (bakterielle Kontamination der Reagenzfläschchen).
- Inkubationswannen nur mit klarem Wasser reinigen, gefolgt von destilliertem Wasser (niemals Detergenzien oder Bleichmittel verwenden).
- Das Auslassen einer Probe oder die Zugabe einer ungeeigneten Menge kann unabhängig vom tatsächlichen Status zu einem negativen Testergebnis führen.

Probenahme

Die Proben aseptisch in trockenen Röhrchen sammeln. Es sind mindestens 10 µl Serum.

Die Proben bis zur Verarbeitung bei 2-8 °C aufbewahren. Wenn sie gelagert werden müssen, die Proben bei -20 ± 5 °C einfrieren. Keine kontaminierten Proben verwenden. Die Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und aufgetaut werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschpuffer: Für 4 Tests in einer sauberen Flasche müssen 10 ml Waschkonzentrat 10X (**R6**) in 90 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden.

Testverfahren

Anmerkung: Es wird die Durchführung von Multiparameterserien empfohlen (siehe Immunoblot-Bandbreite von LDBIO), um die Anzahl geöffneter Fläschchen zu begrenzen und eine bessere Qualitätskontrolle zu erreichen.

1. Für die Proben und C+ positiven Kontrollen muss ein Aufteilungsplan erstellt werden (**R10**).
Nur durch Anwendung dieser Kontrolle kann der Test technisch validiert und eine Identifikation der spezifischen entwickelten Banden für eine bestimmte Seriennummer festgestellt werden. Ein C+ Streifen kann nicht verwendet werden, um die Ergebnisse von Streifen eines Blots einer anderen Seriennummer zu interpretieren.
2. Mit einem Skalpell und einem sauberen und trockenen, flachen, transparenten Lineal die erforderliche Anzahl Streifen (R1) zurechtschneiden, wobei die blaue Positionierungslinie auf den Streifen erhalten bleibt: die Streifen mit dem Lineal festhalten und auf der Seite mit dem Stamm schneiden (die Nummern sind durch das Lineal zu sehen).
3. 1,2 ml des Probenpuffers (R2) gemäß dem erstellten Plan in jeden Kanal verteilen.
4. Die nummerierten Streifen in numerischer Reihenfolge in den Kanälen platzieren: Die Streifen für ca. 1 Minute mit oben sichtbarer Nummer rehydrieren lassen. Hierzu wird die Wanne leicht geschwenkt, damit sie vollständig in den Puffer eintauchen.
5. Proben und positive Kontrolle(n) verteilen: gemäß Aufteilungsplan mit 10 µl pro Kanal. Die Wanne nach jeder Dosierung leicht schütteln. Die Wanne auf einen Wippschüttler stellen. **Für 90 Min. ± 5 Min.** bei 18-25 °C inkubieren.
6. Waschschrift: Den Inhalt des Kanals mit einer Pasteurpipette oder durch Umdrehen der Inkubationswanne entleeren. 2 bis 3 ml verdünnten Waschpuffer in jeden Kanal geben. Auf dem Wippschüttler für 3 Min. inkubieren. Zweimal wiederholen, dann den Inhalt der Kanäle entleeren. Sicherstellen, dass sich die Streifen während dieser Schritte nicht umdrehen.
7. 1,2 ml eines Anti-IgG-Konjugats (R3) in jeden Kanal geben. Die Wanne auf den Wippschüttler stellen.
Für 60 Min. ± 5 Min. bei 18-25 °C inkubieren.
8. Waschschrift: Schritt 6 wiederholen.
9. 1,2 ml NBT/BCIP-Substrat (R5) in jeden der Kanäle geben. Auf den Wippschüttler stellen und vor direkter Lichteinstrahlung schützen. **Für 60 Min. ± 5 Min.** bei 18-25 °C inkubieren.

Unabhängig vom Parameter die Farbentwicklung überwachen. Die Entwicklung kann beendet werden, wenn die Hintergrundfarbe des Streifens so dunkel wird, dass Ablesen schwierig wird (die Qualität der Waschschrift hat einen grundlegenden Einfluss auf die Einfärbung des Hintergrunds). Es muss beachtet werden, dass die Streifen beim Trocknen heller werden.

10. Die Reaktion wird durch Absaugen des Substrats mit einer Pasteurpipette oder Umdrehen der

Inkubationswanne und Hinzufügen von 2 ml destillierten Wassers in die Kanäle gestoppt. Dieser letzte Waschschrift wird noch einmal wiederholt.

11. Trocknen der Streifen: Während die Kanäle noch mit Wasser gefüllt sind, werden die Streifen mit der Pinzette am nummerierten Ende herausgenommen und so, dass die Nummer sichtbar ist, auf Whatman Saugpapier gelegt. An der Luft trocknen lassen. Die Farbe der Streifen wird beim Trocknen natürlicherweise heller. Die Auswertung darf erst stattfinden, wenn die Trocknung abgeschlossen ist.
12. Lagerung: Die Streifen auf ein Blatt Papier legen, auf dem sie archiviert werden. Die Positionslinien ausrichten. Die Streifen werden mit dem flachen Lineal fixiert und oben an den Streifen transparentes Klebeband angebracht.

Für eine gute Auswertung müssen die Streifen nach Transfer und in ihrer numerischen Reihenfolge mit einem maximalen Abstand von ein paar Millimetern angeordnet sein. Der Vergleich von Streifen mit großem Abstand (z. B. Nr. 2 mit Nr. 15) ist unzuverlässig. **Es ist gefährlich** (aufgrund falscher Ergebnisse), Streifen aus verschiedenen Kits (mit verschiedenen Seriennummern) miteinander zu vergleichen.

Qualitätskontrolle und Auswertung

Die im Kit vorhandene Serumkontrolle (R10) muss systematisch in alle Immunoblotserien integriert werden. Sie zeigt das typische Profil und ermöglicht die technische Validierung einer guten Testdurchführung (die Banden müssen auf dem Streifen sehr deutlich erscheinen) und die präzise Kalibrierung der Position und Aspekte der spezifischen Banden für die Auswertung der Ergebnisse von Streifen desselben Transfers (gleiche Seriennummer).

- **Beschreibung der Banden:**

Eine positive Probe kann zahlreiche Bänder zwischen 120 und 7 kDa aufweisen.

Von den mehr oder weniger ausgeprägten Bändern, die man in diesem Bereich vorfindet, erwiesen sich 3 aufgrund ihrer Spezifität, ihrer Sensitivität und ihrer leichten Auswertbarkeit als besonders geeignet: Ein Doppelband bei 8 - 9 kDa, ein breites Band bei 28 kDa (häufig in Verbindung mit einem dünnen Band bei 25 kDa) und ein breites Band bei 42 kDa. Sie werden deshalb folgendermaßen bezeichnet: **P8-9, P28 und P42.**

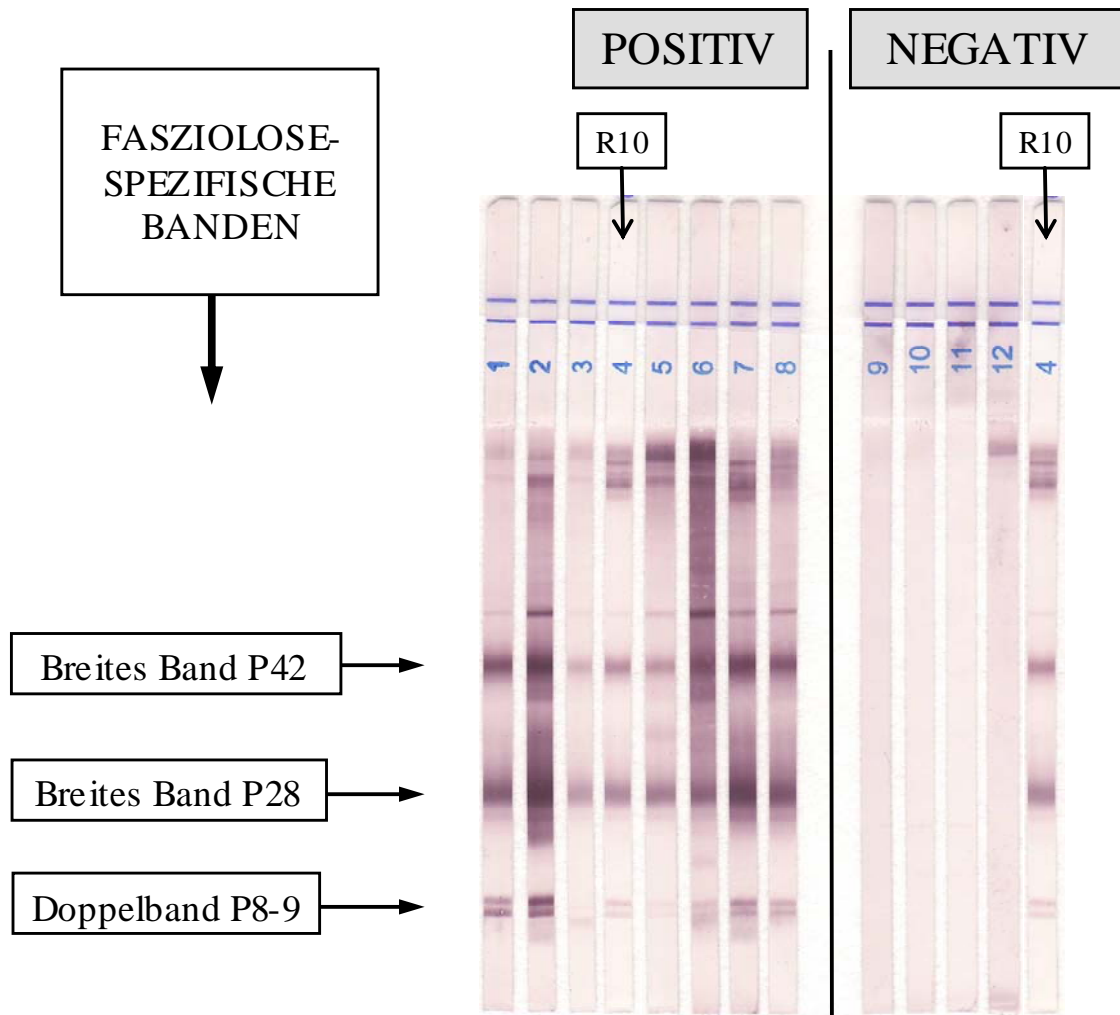


Abb. 1: Beispiele positiver und negativer Ergebnisse

- Auswertung:

Das gleichzeitige Vorhanden sein von zwei Bändern unter den Bändern **P8-9**, **P28**, **P42** und einschließlich P28 ist ein Hinweis auf Fasciolose.

Die oben dargestellten „POSITIVEN“ Streifen zeigen verschiedene Beispiele für vorgefundene spezifische Profile.

Zur Validierung der Ergebnisse muss immer das Profil des Immunoblots jeder Probe mit dem der positiven Kontrolle R10 verglichen werden. Die Aspekte der Banden sind für die Auswertung des Tests wichtig.

Anwendungsbeschränkungen

Diese serologischen Ergebnisse müssen anhand der vorhandenen Informationen (epidemiologisch, klinisch, Bildgebung, biologisch) ausgewertet werden, um eine Diagnose zu erhalten.

Leistung

Die Bewertung der Leistungsfähigkeit des Kits FASCIOLA E/S WB-IgG (*Fasciola hepatica* – **E/S Antigene**) erfolgte durch Vergleich mit der vorausgegangenen Version des Kits LDBIO Diagnostics FASCIOLA WB IgG **ce** (*Fasciola hepatica*- **Gesamt Antigen**), nachfolgend bezeichnet als REFERENZ WB: seit 2004 vermarktet.

- **Sensitivität (Se):**

Die geprüfte Stichprobe umfasst 75 Serumproben von Patienten mit Verdacht auf klinischer Fasziole. Diese 75 Serumproben wurden parallel durch die Verfahren FASCIOLA E/S WB-IgG und REFERENZ WB geprüft.

n=75	REFERENZ WB	FAS ES WB IgG
POSITIV	75	75
NEGATIV	0	0

Tabelle 1: Korrelation FASCIOLA E/S WB IgG / REFERENZ WB
Die Korrelation ist ausgezeichnet (Se=100%)

n = 75

Art der spezifischen Banden (kDa)	P8-9	P28	P42
Häufigkeit %	65.3	100	100

Tabelle 2: Häufigkeit des Auftretens jedes einzelnen spezifischen Bandes, das bei unserer Studie von 75 positiven Proben auf den Immunoblot-Assays vorgefunden wurde.

- **Spezifität:**

151 Serumproben von Patienten mit parasitären oder pilzliche Infektionen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Blutspendern wurden dem Test FASCIOLA E/S WB IgG unterzogen: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (Zystizerkose) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), Malaria (7), *Candida spp* (7), Rheumafaktor RF+ (7), Antinukleäre Antikörper ANA+ (7), Blutspendern (53).

Die Spezifität der Banden P8-9, P28 und P42 des E/S-Antigens beträgt 100 %. Die Banden außerhalb dieses Bereichs werden nicht als spezifisch betrachtet.

- **Reproduzierbarkeit:**

Es wurde die Reproduzierbarkeit zwischen Serien und Chargen geprüft. In beiden Fällen ist die Korrelation hinsichtlich der spezifischen Banden zwischen Sera sehr gut.

- **Beeinträchtigung:**

Obwohl keine besondere Kreuzreaktion mit hämolysierten, ikterischen oder lipidischen Sera beobachtet wurde, wird empfohlen, die Ergebnisse der Verwendung solcher Proben aufmerksam zu beobachten.

Fehlerbehebung

„Die Banden sind blass und weisen kaum Kontrast auf“: Bestimmte Sera mit niedrigen Konzentrationen von Antikörpern können solche Ergebnisse zeigen.

„Es sind schattierte Bereiche sichtbar, mehr oder weniger farbig, leicht diffus“: Der Streifen wurde in eins der Reagenzien nicht vollständig eingetaucht und wurde nicht über seine gesamte Länge korrekt inkubiert. Es können auch Flecken an den Stellen vorhanden sein, an denen die Probe platziert wurde, wenn die Wanne anschließend nicht geschüttelt wurde.

„**Der Hintergrund ist dominant, wodurch das Ablesen sehr schwer wird**“: Die Waschungen waren unzureichend oder die letzte Inkubation zu lang. Gute Techniken zur Testleistung sicherstellen, die Waschzeiten einhalten und die Wasserqualität sicherstellen. Die Zeit der letzten Inkubation reduzieren. In Ausnahmefällen können bestimmte Sera unspezifisch reagieren. Dann ist das Ergebnis des Immunoblots unbrauchbar.

Dieser unspezifische, dominante Hintergrund kann nur einen Teil des Streifens betreffen und somit können nur hier die Ergebnisse nicht ausgewertet werden.

„**Während des letzten Entwicklungsschritts erscheint eine Ausfällung in der Lösung**“: das Substrat kann tatsächlich zum Ende der Entwicklung im Puffer teilweise ausfallen (schwarze Flocken). Dieses Phänomen verändert die Qualität der Entwicklung nicht, die normal fortgesetzt werden sollte. Die letzte Waschung mit destilliertem Wasser entfernt möglicherweise vorhandene feste Partikel.

Literaturverzeichnis

- Agamey, 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.