

TOXOCARA

Western blot IgG



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



#TXA-WB24G: 24 Tests

#TXA-WB12G: 12 Tests

#TXA-WB96G: 96 Tests

GEBRAUCHSANWEISUNG

Verwendungszweck [1]

TOXOCARA Western blot (WB) IgG ist ein qualitativer Test der serologischen IgG-Diagnose mittels Immunoblot-Assay auf Toxocariasis, der als Bestätigungstest bei einem positiven oder mehrdeutigen Ergebnis in klassischen Screeningtests vorgesehen ist. Er kann mit Sera, Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder Kammerwasser durchgeführt werden.

Testprinzip

Westernblot-Technik: Die exkretorischen/sekretorischen (E/S) -Antigene von *Toxocara canis* 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 (oder CSF/Kammerflüssigkeit) wird separat mit einem Streifen inkubiert. Die potenziell in der Probe vorhandenen Anti-*Toxocara*-Antikörper binden selektiv an die E/S-Antigene von *T. canis*. Das alkalische Phosphatase Anti-Human-IgG-Konjugat bindet dann an die gebundenen Anti-*Toxocara*-Antikörper. Abschließend reagieren die Immunkomplexe mit dem Substrat. Die in den Proben vorhandenen, von den Anti-*Toxocara*-Antikörpern erkannten Antigene vom Typ IgG werden als violette querverlaufende Banden dargestellt.

Im Kit enthaltene Reagenzien

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

ID	Menge	Beschreibung	Zusammensetzung
R1	1	Block/Blöcke mit 24 (<i>12</i> , 4 x 24) 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.
R2	1	Fläschchen mit 30 (<i>30</i> , 125) ml PROBENPUFFER (Gebrauchsfertig – rosafarbene Lösung).	Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %).
R3	1	Fläschchen mit 30 (<i>30</i> , 2 x 60) 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</i> , 125) ml SUBSTRAT (Gebrauchsfertig – opakbraunes Fläschchen).	Puffer + NBT + BCIP + Stabilisatoren.
R6	1	Fläschchen mit 60 (<i>60</i> , 250) ml WASCHKONZENTRAT 10X PUFFER (<u>Muss in destilliertem Wasser 10-fach verdünnt werden</u> – farblose Lösung).	Puffer + Tensid + NaN ₃ (< 0,1 %).
R10	1	Röhrchen mit 100 (<i>100</i> , 2 x 100) µl POSITIVEM KONTROLLSERUM (Gebrauchsfertig – rote Kappe).	Puffer + Sammelprobe von Humanseren mit positiver <i>Toxacara</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 10 µl, 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,

Kammerflüssigkeit oder CSF erforderlich. Im Fall von Kammerflüssigkeit oder CSF erhöht die Verwendung von 25 µl die Sensitivität des Tests.

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 (möglichst 25 µl bei Kammerwasser oder CSF). 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 Waschschriffe 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 Waschschriffe 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 Banden zwischen 15 und 200 Kilodalton (kDa) zeigen. Bei jeder geprüften Probe sollte mit den oben beschriebenen Auswertungsmaßnahmen nach niedermolekularen (NM) Banden mit 24-35 kDa gesucht werden. Diese gruppierten und gut isolierten Banden sind charakteristisch und allgemein leicht zu finden.

Zwei hochmolekulare (HM) Bandgruppen können eventuell in den Bereichen 70-90 kDa und 100-200 kDa beobachtet werden. Diese Banden sind nicht Toxocaridose-spezifisch: es kann eine Kreuzreaktion mit einer anderen Helminthiasis vorliegen.

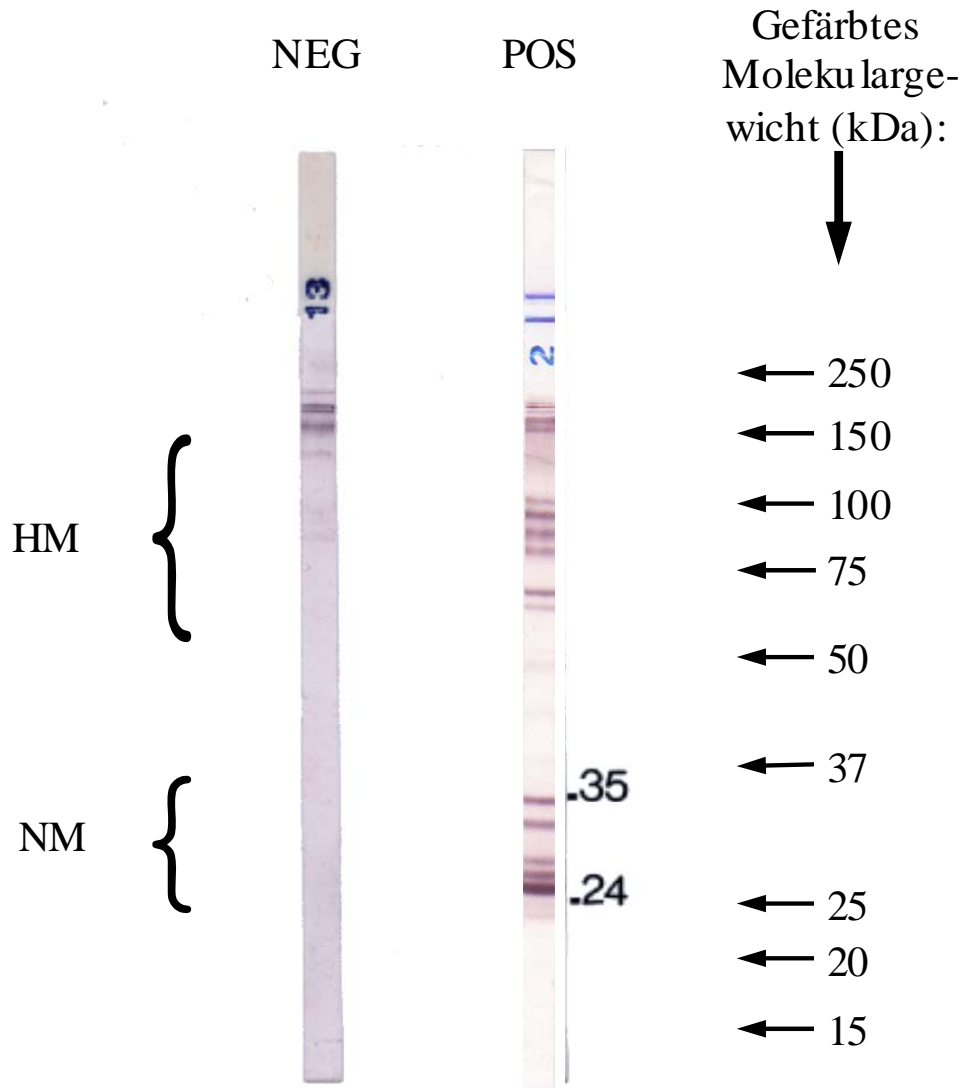


Abb. 1: Beispiele positiver und negativer Ergebnisse

- Auswertung:

Das **simultane** Auftreten von 2 Banden zwischen 24 und 35 kDa zeigt das Vorliegen von Anti-*Toxocara* spezifischen Antikörpern an.

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, Bildung, biologisch) ausgewertet werden, um eine Diagnose zu erhalten.

Leistung

Der *Toxocara* WB IgG Test war Gegenstand einer Vergleichsstudie mit dem Referenz-Immunoblot des Toulouse CHU [Centre Hospitalier Universitaire (Universitätsklinik)][2], [3].

Die Auswertungskriterien und die Leistung der beiden Tests sind gut vergleichbar.

- **Spezifität:** [3]

Die Spezifität der 24–35 Banden des E/S-Antigens beträgt 100 %. Die Banden außerhalb dieses Bereichs werden nicht als spezifisch betrachtet.

- **Sensibilität:** [4]-[9]

Die Daten der Fachliteratur beschreiben die exzellente Sensibilität des *Toxocara* WB IgG Tests, die oft deutlich höher ist als die des E/S ELISA Screeningtests, und den Immunoblot als Diagnose- und Bestätigungstechnik bestätigt.

Hinweis: Der numerische Wert der Sensibilität kann nicht berechnet werden, weil eine diagnostische Referenzmethode fehlt.

- **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

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] J. Fillaux et J.-F. Magnaval, « Laboratory diagnosis of human toxocariasis », *Vet. Parasitol.*, vol. 193, n° 4, p. 327-336, avr. 2013.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.