

# TOXOCARA

## Western blot IgG



Analisi immunoblot per uso  
diagnostico *in vitro*



#TXA-WB24G: 24 test

#TXA-WB12G: 12 test

#TXA-WB96G: 96 test

## ISTRUZIONI PER L'USO

### Destinazione d'uso [1]

TOXOCARA Western Blot (WB) IgG è un test qualitativo per la diagnosi delle IgG sieriche con analisi Immunoblot della toxocariosi intesa come analisi di conferma dei risultati positivi o dubbi ottenuti con le classiche analisi di screening. Il Test può essere eseguito su siero, liquido cerebrospinale (CSF) o umor acqueo.

### Principio del test

La tecnica Western Blot: gli antigeni escretori/secretori (E/S) della *Toxocara canis*, dopo l'isolamento mediante elettroforesi, con l'esecuzione dell'elettroblot si legano alla superficie della membrana di nitrocellulosa (denominata transfer) suddivisi in 24 strisce numerate da 1 a 24.

Principio del test: Ciascun campione di siero (o CSF/umor acqueo) da analizzare viene incubato separatamente con una striscia. Gli anticorpi anti -*Toxocara*, potenzialmente presenti nel campione, si legano in modo selettivo agli antigeni E/S della *T. canis*. Le IgG umane coniugate a fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi anti-*Toxocara*.. Gli immunocomplessi formati reagiscono con il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi anti-*Toxocara* di classe IgG presenti nel campione appaiono come strisce trasversali di colore viola.

## Reagenti forniti con il kit

*Corsivo:* confezione da 12 test (#TXA-WB12G) - **Grassetto:** Confezione da 96 test (#TXA-WB96G).

Cod.	Q.tà	Descrizione	Composizione
R1	1	Confezione da 24 (12, <b>4x24</b> ) STRISCE: standard pretagliate + colorate. (Ogni cartella e ogni adesivo sono identificati da un numero di serie univoco)	Nitrocellulosa sensibilizzata. Peso molecolare colorati (kDa): blu: 250, blu: 150, blu: 100, rosa: 75, blu: 50, verde: 37, rosa: 25, blu: 20, blu: 15.
R2	1	Fiala da 30 (30, <b>125</b> ) ml di BUFFER DILUENTE SIERI (pronto all'uso, soluzione rosa).	Buffer + tensioattivo + NaN3 (<0,1%).
R3	1	Fiala/e da 30 (30, <b>2x60</b> ) ml di CONIUGATO ANTI IgG (pronto all'uso, soluzione blu).	Buffer + sieri policlonali di capra con anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.
R5	1	Fiala da 30 (30, <b>125</b> ) ml di SUBSTRATO (pronto all'uso, fiala marrone opaca).	Buffer + NBT + BCIP + stabilizzatori.
R6	1	Fiala da 60 (60, <b>250</b> ) ml di 10 SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA (da diluire in 10 parti di acqua distillata; soluzione incolore).	Buffer + tensioattivo + NaN3 (<0,1%).
R10	1	Provetta da 100 (100, <b>2x100</b> ) µl di SIERO DI CONTROLLO POSITIVO (pronto all'uso; cappuccio rosso).	Buffer + serie di sieri umani positivi per sierologia <i>Toxocara</i> + NaN3 (<0,1%) + stabilizzatori.

**R2, R3, R5 e R6 sono uguali per tutti i kit e hanno un unico numero di lotto che dipende esclusivamente dalla data di produzione.** Si raccomanda di eseguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

### Altro materiale richiesto non incluso nella fornitura

- Vassoi di incubazione multi-canale in polipropilene per miniblot (#WBPP-08 o equivalenti).
- Piattaforma oscillante per immunoblot, sistema di aspirazione per liquidi (le vaschette #WBPP-08 da noi fornite possono essere svuotate semplicemente capovolgendole).
- Provette e materiale per il prelievo dei campioni, cilindri graduati, contenitori adattati.  
Pipette automatiche, micropipette e punte usa e getta (10 µl, 25µl, 1,2 ml e 2 ml di volume).
- Acqua distillata o deionizzata. Carta assorbente (es. carta da filtro Whatman), nastro adesivo trasparente.
- Guanti in lattice, pinzette per maneggiare le strisce, cutter o bisturi, righello piatto trasparente.

Nota: I nostri reagenti possono essere utilizzati in un preparatore immunoblot automatico. **Prestare attenzione alle possibili contaminazioni chimiche dei nostri reagenti se il preparatore viene anche usato con reagenti di altro produttore** (per es. è nota la contaminazione da TWEEN 20), e alle contaminazioni batteriche. Tenere scorte di fiale per il preparatore. Dopo l'uso, non riporre i residui di reagenti nelle fiale originali.

## Conservazione e stabilità

Conservare tra 2 e 8 °C. I reagenti contenuti nel kit sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla scatola esterna e sulle etichette delle fiale. Il buffer di detergente diluito a 1/10 è stabile per due mesi a temperature comprese fra +2 e +8 °C e per una settimana a temperatura ambiente.

## Precauzioni d'uso

### Sicurezza

- Solamente per uso *in vitro*. Maneggiare secondo le Buone pratiche di laboratorio (BPL) e considerare ogni reagente e ogni campione come potenzialmente tossici e/o infettivi.
- Indossare il camice, guanti e occhiali da laboratorio; non bere, mangiare o fumare all'interno del laboratorio. Non mettere in bocca le pipette.
- Il controllo positivo è un siero di origine umana che alle analisi è risultato negativo agli anticorpi dell'HIV1 e 2 e agli anticorpi dell'HCV, oltre che all'antigene dell'epatite B. Deve comunque essere maneggiato come un prodotto potenzialmente infettivo.
- Il substrato contiene una miscela di NBT e BCIP, tossica al tatto (per pelle e mucose) e per inalazione.
- I reagenti contengono sodio azide, che può generare sali metallici esplosivi a contatto con piombo e rame. Sciacquare ogni residuo con acqua.
- Smaltire i materiali di scarto (campionature, beccucci, provette, liquido detergente, reagente usato...) secondo le buone pratiche previste dal settore e dalle normative nazionali attualmente in vigore.

### Precauzioni

- Non utilizzare insieme reagenti provenienti da lotti diversi.
- Usare le strisce in ordine numerico. Non mescolare strisce provenienti da lotti con numeri di serie diversi; usare le etichette in sequenza progressiva. Programmare un piano di distribuzione specifico prima di iniziare il test.
- Non toccare le strisce con le dita; usare le pinzette.
- I reagenti devono essere miscelati bene prima dell'uso, soprattutto il buffer di detergente concentrato.
- Chiudere le fiale dopo l'uso; non usare i reagenti se accidentalmente contaminati da un'altra sostanza. Non usare il reagente contenuto in una fiala che presenta segni di perdite. Non usare la soluzione se appare torbida o sedimentata.
- Per le pipette usare solamente punte usa e getta. Evitare qualunque contaminazione tra i vari canali. Verificare l'eventuale formazione di schiuma o bolle all'interno delle punte delle pipette (contaminazione batterica delle fiale di reagente).
- I vassoi di incubazione devono essere lavati solamente con acqua pulita seguita da acqua distillata (non usare mai detersivi o candeggianti).
- L'omissione di un campione o la distribuzione di volume inadeguato può rendere negativo il risultato del test, indipendentemente dalle condizioni specifiche.

## Raccolta dei campioni

Raccogliere i campioni in modo asettico all'interno di provette asciutte. La quantità minima richiesta è di 10 µl di siero, umor acqueo o CSF. Nel caso di umor acqueo o CSF, usare 25 µl aumenta la sensibilità del test.

Conservare i campioni a temperatura di 2-8 °C fino al momento dell'utilizzo. Nel caso sia necessaria la refrigerazione, congelare i campioni a temperatura di  $-20 \pm 5$  °C. Non utilizzare i campioni contaminati. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

## Preparazione dei reagenti

**Soluzione di lavaggio:** Per 4 test: in una bottiglia pulita, diluire 10 ml di detergente concentrato 10X (R6) in 90 ml di acqua distillata o deionizzata.

## Come si esegue il test

*N.B.: Si raccomanda di seguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.*

1. Programmare un piano di distribuzione dei campioni e del controllo positivo a C+ (**R10**).  
Solamente usando questo controllo il test è tecnicamente valido ed è possibile identificare, per un determinato numero di serie, le strisce generate. Una striscia C+ non può essere utilizzata per interpretare i risultati delle strisce generate da un diverso numero di serie.
2. Tagliare il numero richiesto di strisce (R1) con un bisturi e un righello trasparente piatto, pulito e asciutto, tenendo la riga blu di posizionamento sulle strisce: tenere ben ferme le strisce con il righello e tagliarle lungo il lato in cui si esercita la pressione (i numeri sono leggibili attraverso il righello).
3. Distribuire 1,2 ml di tampone di diluizione (R2) in ciascun canale secondo il piano di distribuzione stabilito.
4. Depositare, in sequenza, le strisce numerate all'interno dei canali. Far reidratare le strisce per circa 1 minuto, con il numero ben visibile in alto, agitando delicatamente il vassoio e facendole immergere completamente nel buffer.
5. Distribuire i campioni e il controllo/i positivo/i: in base al piano di distribuzione, in misura di 10 µl per canale (preferibilmente 25 µl per umor acqueo o CSF). Agitare delicatamente il vassoio dopo ogni erogazione. Posizionare il vassoio su una piattaforma oscillante. **Mettere in incubazione per 90 min**  $\pm 5$  min a 18-25 °C.
6. Fase di lavaggio: Eliminare il contenuto dai canali usando una pipetta Pasteur o capovolgendo il vassoio di incubazione. Versare da 2 a 3 ml di soluzione di lavaggio in ciascun canale. Mettere in incubazione sulla piattaforma di agitazione per 3 min. Ripetere l'operazione due volte, quindi eliminare il contenuto dai canali. Assicurarsi che le strisce non si capovolgano durante questi passaggi.
7. Versare 1,2 ml di coniugato anti-IgG (R3) in ciascun canale. Posizionare il vassoio sulla piattaforma oscillante. **Tenere in incubazione per 60 min**  $\pm 5$  min a 18-25 °C.
8. Fase di lavaggio: ripetere la fase 6.
9. Distribuire 1,2 ml di substrato NBT/BCIP (R5) in ciascun canale. Posizionare sulla piattaforma oscillante proteggendo dalla luce diretta. **Tenere in incubazione per 60 min**  $\pm 5$  min a 18-25 °C.

Indipendentemente dal parametro, tenere sotto controllo lo sviluppo del colore. Il processo può essere interrotto se il colore di fondo della striscia si scurisce rendendo difficoltosa la lettura (la qualità delle fasi di lavaggio influisce fortemente sulla colorazione di fondo). Ricordare che asciugando le strisce schiariscono.

10. Interrompere la reazione aspirando il substrato con una pipetta di Pasteur o capovolgendo la vasca di incubazione e versando 2 ml di acqua distillata nei canali. Ripetere quest'ultimo passaggio di lavaggio ancora una volta.
11. Asciugatura delle strisce: Con i canali ancora pieni di acqua, prendere le strisce dal lato numerato con le pinzette e depositarle, con il numero visibile, su carta da filtro Whatman. Fare asciugare all'aria. Il colore delle strisce si schiarisce naturalmente durante l'asciugatura. L'interpretazione deve essere eseguita dopo la completa asciugatura.
12. Conservazione: Trasferire le strisce su un foglio di carta, che servirà per archivarle. Allineare le righe di posizionamento. Tenendole ferme con il righello piatto, fermare le strisce sulla sommità con del nastro adesivo trasparente.

Per una buona interpretazione, le strisce devono essere ordinate per etichetta adesiva in sequenza numerica, distanziate tra loro alcuni millimetri al massimo. Non è affidabile effettuare il confronto di strisce molto distanziate tra loro (es. la striscia n. 2 con la n. 15). **È pericoloso** (falsi risultati) effettuare il confronto di strisce provenienti da confezioni diverse (strisce con numeri di serie diversi).

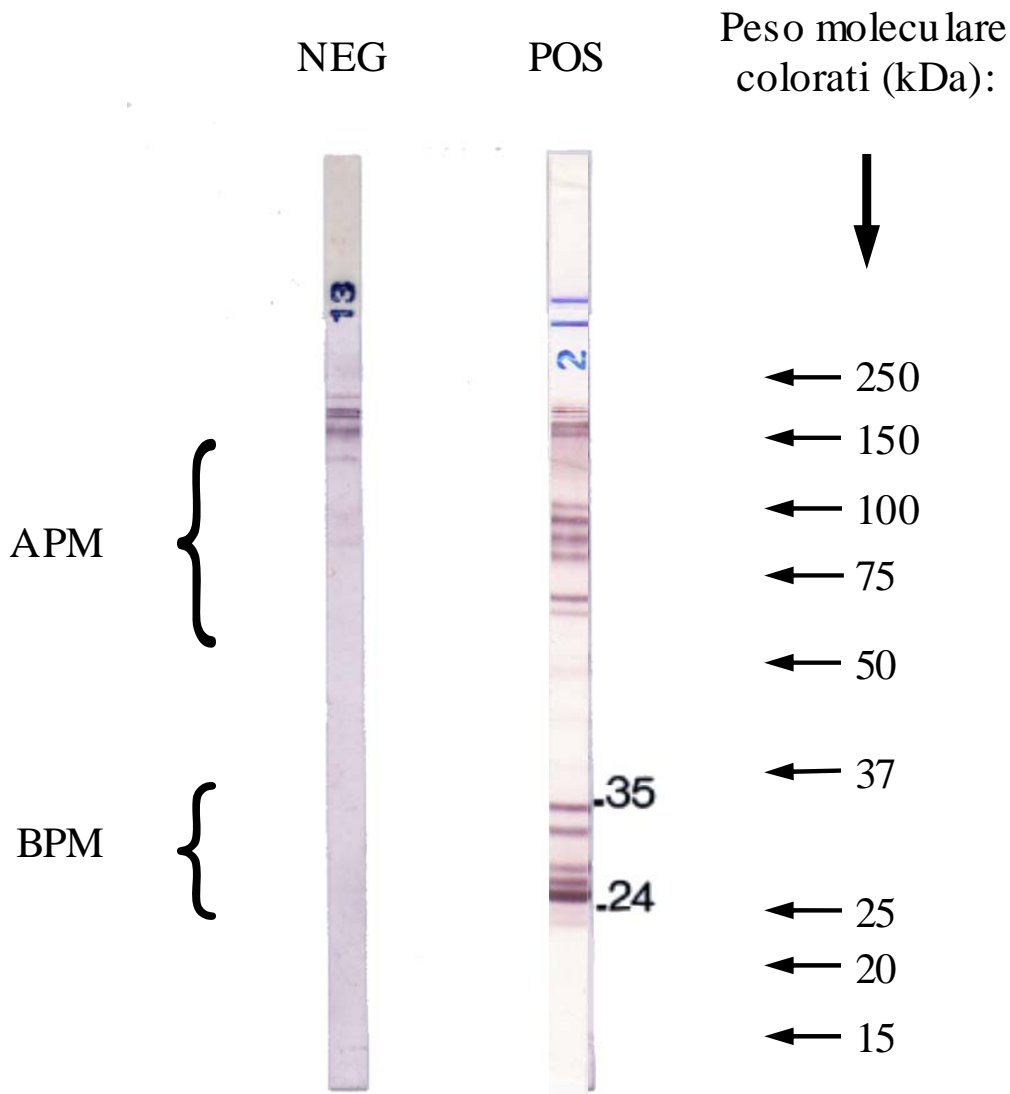
## Controllo qualità e interpretazione

Il controllo del siero (R10) fornito nella confezione deve essere sistematicamente incluso in qualsiasi serie di immunoblot. Mostra il profilo di riferimento e garantisce tecnicamente la riuscita del test (le bande devono apparire in modo evidente sulla striscia) e la calibrazione precisa della posizione e dell'aspetto delle bande specifiche, consentendo l'interpretazione dei risultati delle strisce provenienti dallo stesso adesivo (con lo stesso numero di serie).

- Descrizione delle bande colorate:

Un campione positivo può mostrare numerose bande colorate tra i 15 e i 200 kilodalton (kDa). Cercare le bande colorate di 24-35 kDa di basso peso molecolare (BPM) per ciascun campione esaminato utilizzando gli strumenti di identificazione sopra descritti. Queste bande colorate, raggruppate e ben distinte, sono tipiche e generalmente di facile identificazione.

Due gruppi di bande di alto peso molecolare (APM) si possono osservare nell'intervallo compreso tra 70-90 kDa e 100-200 kDa. Queste bande non sono specifiche della toxocariasi; è possibile si tratti di una reazione incrociata con un'altra elmintiasi.



**Fig. 1:** Esempi di risultato positivo e negativo

- Interpretazione

La presenza **simultanea** di due strisce tra i 24 e i 35 kDa è indicativa della presenza di anticorpi specifici anti-*toxocara*.

*Per convalidare i risultati, raffrontare sempre il profilo dell'immunoblot di ogni campione con quello del controllo positivo su R10. L'aspetto delle bande colorate è importante per l'interpretazione del test.*

### Limitazioni d'uso

Per poter definire la diagnosi i risultati sul siero devono essere interpretati sulla base dei dati disponibili (epidemiologiche, cliniche, radiologiche, biologiche).

## Prestazioni

Il test delle IgG WB per la *Toxocara* è stato oggetto di uno studio comparativo condotto con l'immunoblot di riferimento della CHU [(Centre Hospitalier Universitaire)] di Tolosa[2], [3]. I criteri di interpretazione e la performance dei due test sono fortemente comparabili.

- Specificità: [3]

La specificità delle 24-35 bande generate dall'antigene E/S è del 100%. Le bande esterne a questo intervallo non sono ritenute caratteristiche.

- Sensibilità: [4]-[9]

I dati presenti in letteratura definiscono ottima la sensibilità del test IgG WB sulla *Toxocara*, spesso addirittura superiore a quella degli altri test ELISA E/S, confermando la posizione dell'immunoblot come tecnica diagnostica e probante.

Nota: Il livello di sensibilità non può essere espresso con valore numerico non essendo disponibile un metodo diagnostico di riferimento.

- Riproducibilità:

La riproducibilità all'interno delle serie e dei lotti è stata testata. In entrambi i casi, la correlazione esistente tra siero e siero rispetto alle specifiche bande colorate è eccellente.

- Interferenze:

Sebbene nessuna particolare reazione incrociata sia stata osservata con il siero emolitico, itterico o lipidico, si raccomanda di interpretare i risultati di tali campioni con cura.

## Ricerca e soluzione di eventuali problematiche

**“Le bande colorate sono tenui e hanno poco contrasto”**: Alcuni sieri con bassa concentrazione di anticorpi possono dare risultati di questo tipo.

**“Si vedono zone sfumate, più o meno colorate, appena diffuse”**: La striscia non è stata completamente immersa in uno dei reagenti e non è stata incubata correttamente su tutta la lunghezza. Possono anche comparire delle macchie nel punto di appoggio del campione, se il vassoio non è stato ben agitato dopo l'erogazione.

**“Il rumore di fondo è notevole e rende la lettura molto difficoltosa”**: I lavaggi non sono stati sufficienti oppure l'ultima incubazione è durata troppo. Assicurarsi di seguire le giuste tecniche procedurali, rispettare i tempi di lavaggio e assicurarsi della qualità dell'acqua. Ridurre il tempo dell'ultima incubazione. Eccezionalmente, alcuni sieri reagiscono in modo anomalo. Pertanto, il risultato dell'immunoblot non è utilizzabile.

Questo rumore di fondo anomalo può interessare solamente parte della striscia, rendendo impossibile l'interpretazione di quella sola parte.

**“Durante l'ultima fase di sviluppo nella soluzione compare un precipitato”**: il substrato potrebbe in parte precipitare (fiocchi neri) nel buffer alla fine dello sviluppo. Questo fenomeno non altera la qualità dello sviluppo che deve proseguire normalmente. L'ultimo lavaggio con acqua distillata elimina le particelle solide eventualmente presenti.

## Bibliografia

- [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.