

# CYSTICERCOSIS CE



## Western Blot IgG

*Ин vitro* диагностика Имуноблот анализ

Полуавтоматизирана / ръчна техника

#CYS-WB24G: 24 теста

#CYS-WB12G: 12 теста

#CYS-WB96G: 96 теста

## Инструкции за употреба

Намерете повече информация и инструкции за употреба на вашия език на нашия уебсайт [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

**CYSTICERCOSIS Western Blot (WB) IgG** е качествен тест за еднократна употреба за серологична IgG диагностика чрез имуноблот анализ на цистицеркоза предназначен за потвърждаващо изследване на положителен или граничен резултат, получен чрез класически скринингови тестове. Тестът може да се извърши със серум или гръбначно-мозъчна течност (ликвор).

## ПРИНЦИП НА ТЕСТА

### Уестърн блот техника

Антигените (екстракт от цистицерки *Taenia solium* от свински произход), разделени чрез електрофореза, се свързват чрез електроблотинг към повърхността на нитроцелулозна мембрана (т.нар. трансфер), нарязана на 24 ленти, номерирани от 1 до 24.

### Изпълнение на теста

Всяка проба която ще се тества, се инкубира отделно с тест-стрип лента. Специфичните антителата, потенциално налични в пробата, селективно се свързват към антигените. Алкално-фосфатазно свързаният човешки IgG конюгат след това се свързва към свързаните антитела. Накрая, имунокомплексите реагират със субстрата. Антигените, разпознати от специфичните антитела от тип IgG, присъстващи в пробите, се разкриват като лилави напречни ивици (бандове).

## РЕАКТИВИ ДОСТАВЕНИ

По подразбиране: опаковка от 24 теста (#CYS-WB24G)

В курсив: опаковка от 12 теста (#CYS-WB12G) – в **подчертан шрифт**: опаковка от 96 теста (#CYSWB96G)

Идентификация	Колво	Описание	Състав
R1	1	Папка(и) с 24 (12, <b>4x24</b> ) ЛЕНТИ: предварително нарязани + оцветени стандарти. (Всяка папка и всеки трансфер се идентифицира с уникален сериен номер)	Сенсибилизирана нитроцелулоза. Цветно маркирано молекулно тегло (kDa): Син: 250, Син: 150, Син: 100, Розов: 75, Син: 50, Зелен: 37, Розов: 25, Син: 20, Син: 15, Жълт: 10.
R2	1	Флакон с 30 (30, <b>125</b> ) mL БУФЕР ЗА ПРОБИ (Готов за употреба – розов разтвор).	Буфер + сърфактант + NaN <sub>3</sub> (<0.1%).
R3	1	Флакон(и) с 30 (30, <b>2x60</b> ) mL АНТИ IgG КОНЮГАТ (Готов за употреба – син разтвор).	Буфер + анти-човешки IgG поликлонален кози серум, конюгиран с алкална фосфатаза + NaN <sub>3</sub> (<0.1%) + стабилизатори.
R5	1	Флакон с 30 (30, <b>125</b> ) mL СУБСТРАТ (Готов за употреба – непрозрачен кафяв флакон).	Буфер + NBT + BCIP + стабилизатори.
R6	1	Флакон с 60 (60, <b>250</b> ) mL ИЗМИВАЩ КОНЦЕНТРАТ 10X БУФЕР (Да се разрежи 1:10 с дестилирана вода – безцветен разтвор).	Буфер + сърфактант.
R10	1	Туба с 200 (200, <b>2x200</b> ) µL ПОЗИТИВЕН КОНТРОЛЕН СЕРУМ (Готов за употреба – червена капачка).	Буфер + пул от човешки серуми, позитивни за цистицеркоза серология + NaN <sub>3</sub> (<0.1%) + стабилизатори.

**R1:** Буквата пред всеки номер на лентата е специфична за параметъра.

**R2, R3, R5 и R6** са общи за всички китове и имат уникален номер на партидата в зависимост от датата на тяхното производство. **Препоръчително е да се извърши изследване с много параметри (вж. имуноблот**

**диапазон на LDBIO), за да се ограничи броят на отворените флакони и да се осигури по-добър контрол на качеството.**

**R10** е калибриран в имуноблот според референтна партида и е посветен само на тази техника.

R3, R10 (NaN<sub>3</sub>): EUN 032 - При контакт с киселини се отделя силно токсичен газ.

EUN 210 Информационен лист за безопасност ще бъде представен при поискване, както и на нашия уебсайт [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com)

## НЕОБХОДИМИ ДОПЪЛНИТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СА ПРЕДОСТАВЕНИ

- Многоканални полипропиленови тави за инкубиране за мини-блоти (# WBPP-08 или еквивалент).
- Люлееща се платформа за имуноблоти, вакуумна система за течности (# WBPP-08 туби, които доставяме, могат да се изпразнят, като просто се обърнат наобратно).
- Туби и материали за вземане на проби, градуирани цилиндри, адаптирани контейнери. Автоматични пипети, микропипети и връхчета за еднократна употреба (с обем от 25 µL, 1.2 mL и 2 mL).
- Дестилирана или дейонизирана вода. Абсорбираща хартия (напр. филтърна хартия Whatman), прозрачно тиксо.
- Ръкавици, пинсети за работа с лентите, нож или скалпел, плоска прозрачна линия.

**Важно:** Нашите реактиви могат да се използват в автоматизирана имуноблот система. **Трябва да се внимава за възможно химично замърсяване на нашите реактиви, ако системата се използва с реактиви на друг производител** (известен пример: замърсяване с TWEEN 20) и бактериално замърсяване. Запазете флаконите за процесора След обработка не поставяйте останалите използвани реактиви обратно в оригиналните флакони.

## СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ

Съхранявайте при температура от +2 до +8°C. Реактивите от кита са стабилни до изтичане на срока на годност, указан върху външната кутия и етикетите на флаконите. Не използвайте замърсен или мътен реагент. Измиващият буфер, разреден до 1/10, е стабилен за 2 месеца при температура от +2 до +8°C и една седмица на стайна температура.

## ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ ПРИ УПОТРЕБА

### Безопасност

- Само за *in vitro* употреба. Само за професионална употреба. Само за технически обучен персонал. Работете в съответствие с добрите лабораторни практики и считайте всеки реактив и всяка проба за потенциално токсични и/или инфекциозни.
- Носете лабораторни престилка, ръкавици и очила. Не пийте, не яжте и не пушете в лабораторията. Не слагайте пипетите в устата си.
- Положителната контрола е серум от човешки произход, който е инактивиран за вируси ХИВ 1 и 2, хепатит В и хепатит С. Въпреки това, с него трябва да се работи като с потенциално инфекциозен продукт.
- Субстратът съдържа смес от NBT и BCIP, които са токсични при контакт (кожа и лигавици) и при вдишване.
- Реактивите съдържат натриев азид, който може да образува експлозивни метални соли с олово и мед. Изплаквайте с вода всяко разливане.
- Изхвърлете отпадъците (проби, връхчета, туби, измиваща течност, използван реактив и т.н.) според добрите практики, използвани в индустрията и действащите в страната нормативни актове.
- Всеки сериозен инцидент трябва да бъде предмет на декларация пред производителя и компетентния орган.

### Предпазни мерки

- Прочетете и интерпретирайте резултатите под пряка бяла светлина.
- За предпочитане е всички реагенти да се използват от една и съща партида. Ако се използват различни партиди, осигурете проследимост.
- Използвайте лентите по реда на номерата. Не събирайте ленти с различни серийни номера. Извършвайте прехвърлянето последователно. Установете конкретен план за работа преди да започнете теста.
- Не докосвайте лентите с пръсти. Използвайте пинсети.
- Реактивите трябва да се смесят добре преди употреба, особено концентрирания измиващ буфер.
- Затваряйте флаконите след употреба. Не ги използвайте, ако в реактивите случайно е попаднало вещество. Не използвайте реактив от флакон с видими следи от изливане. Не използвайте мътен или с утайка разтвор.
- Използвайте само връхчета за пипети за еднократна употреба. Избягвайте между канални замърсявания. Следете за образуването на пяна или мехурчета във връхчетата на пипетите (бактериално замърсяване на флаконите с реактиви).
- Почиствайте подносите за инкубиране първо само с дестилирана вода (никога не използвайте почистващ препарат или белина).
- Неизползването на проба или използването на недостатъчен обем може да доведе до отрицателен или положителен резултат от тест, независимо от действителното му състояние.

## ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ

Вземайте асептично пробите в сухи епруветки. Необходими са минимум 25 µl серум или ликвор. Ако ще използвате ликвор, количество от 50 µl ще повиши чувствителността на теста.

До започване на работа, съхранявайте пробите при температура от +2 до +8°C. Ако трябва да ги съхранявате за по-дълго време, замразете ги при температура -20 ± 5°C. Не използвайте замърсени проби. Избягвайте многократното замразяване и размразяване на пробите.

Въпреки че не се наблюдава особена кръстосана реакция при хемолизирани, иктерични или липидни серуми, препоръчва се резултатите от такива проби да се тълкуват внимателно.

## ПОДГОТОВКА НА РЕАКТИВИТЕ

**Измиващ буфер:** За 4 изследвания, в чиста бутилка се разреждат 10 mL измиващ концентрат 10X (R6) в 90 mL дестилирана или дейонизирана вода. Внимавайте да смесите разреждения буфер.

## ПРОЦЕДУРА НА ТЕСТА

*Внимание:* Препоръчително е да се извърши изследване с много параметри (вж. имуноблот диапазон на LDBIO), за да се ограничи броят на отворените флакони и да се осигури по-добър контрол на качеството.

1. Подгответе план за разпределение на пробите и C+ положителните контроли (R10).

Само с помощта на тази контрола тестът може да бъде технически валидиран и да се направи идентификация за даден сериен номер, както и на развитието на конкретните ленти. C+ лента не може да се използва за тълкуване на резултатите от ленти от блот с различен сериен номер.

2. Нарезжете необходимия брой ленти (R1) с помощта на скалпел и чиста и суха плоска прозрачна линия, като задържите линията в синята позиция на лентите: придържайте лентите здраво на мястото им с линията и ги отрежете от страната на оцветяване (номерата се виждат през линията).
3. Добавете 1.2 mL от буфера за проби (R2) във всеки канал съгласно изготвения план.
4. Поставете лентите по реда на номерата им в каналите: Оставете лентите повторно да се хидратират за около 2 минути, като номерът трябва да е видим отгоре и внимателно разклащайте тавата, за да се потопят изцяло в буфера.
5. Разпределете пробите и положителните контроли: в съответствие с плана, при количество 25 µL на канал (за предпочитане 50 µl когато използвате ликвор). Леко разклатете подноса за инкубиране след всяко разпределение. Поставете подноса върху люлееща се платформа на стайна температура
  - Серум: **инкубирайте за 90 минути ± 5 минути** при температура 20-26°C.
  - Ликвор: **инкубирайте за една нощ (16 часа +/- 2 часа)** при температура 20-26°C. Трябва да покриете подноса за инкубиране с фолио, за да предотвратите изсъхване.
6. Етап на измиване: Изпразнете съдържанието на каналите с пипета Pasteur или обърнете подноса за инкубация наобратно. Използвайте 2 до 3 mL разреден измиващ буфер във всеки канал. Инкубирайте върху люлеещата се платформа за 3 минути. Повторете два пъти, след това изпразнете съдържанието на каналите. Уверете се, че лентите не се преобръщат по време на тази процедура.
7. Накапете 1.2 mL от анти IgG конюгат (R3) във всеки канал. Поставете тавата за инкубиране върху люлеещата се платформа.
 

**Инкубирайте 60 минути ± 5 минути** при температура 20-26°C.
8. Етап на измиване: повторете дейностите, посочени в точка 6.
9. Разпределете по 1.2 mL NBT/BCIP субстрат (R5) във всеки канал. Поставете върху люлеещата се платформа като я предпазвате от пряка светлина. **Инкубирайте за 60 минути ± 5 минути** при температура 20-26°C.

Независимо от параметъра, наблюдавайте развитието на цвета. Развитието може да бъде спряно, ако цветния фон на лентата потъмнее до точка, в която четенето става трудно (качеството в етапа на измиване има съществено влияние за оцветяването на фона). Имайте предвид, че тест-лентите ще станат по-светли, когато изсъхнат.

10. Стопирайте реакцията чрез аспириране на субстрата с пипета Pasteur или чрез обръщане на тавата за инкубиране наобратно и като впръскате 2 mL дестилирана вода в каналите. Повторете тази последна стъпка на измиване още веднъж.
11. Изсушаване на лентите: Докато каналите са все още пълни с вода, хванете лентите с пинсетите от края с номер и ги поставете върху абсорбираща хартия Whatman, като номера трябва да е видим. Оставете ги да изсъхнат на въздух. Цветът на лентите ще става по-светъл, докато лентите съхнат. Тълкуването трябва да се извърши след като лентите изсъхнат напълно.
12. Съхранение: Прехвърлете лентите върху лист хартия, който ще се използва за съхранението им. Подравнете ги. Дръжте ги неподвижни с плоската линия и залепете горният им край с прозрачно тиксо.

За добро интерпретиране на резултатите, лентите трябва да се подредят по реда на прехвърляне и реда на номерата, разположени най-много на няколко милиметра разстояние една от друга. Не е надеждно да се сравняват ленти, които са разположени на голямо разстояние една от друга (например № 2 с номер 15). **Опасно е** (неверни резултати) да се сравняват ленти от различни китове (ленти с различни серийни номера). results) to compare strips from different kits (strips with different serial numbers).

## КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО И ТЪЛКУВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

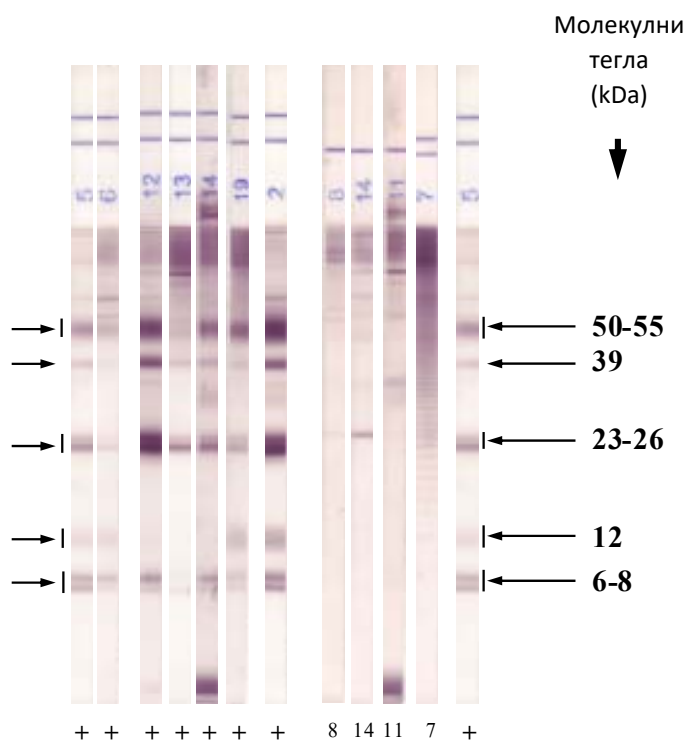
Серумната контрола (R10), предоставена с кита, трябва систематично да се включва във всяка серия имуноблот. Тя показва типичния профил и дава възможност за техническо валидиране на доброто протичане на теста (линиите трябва да се появяват много ясно върху лентата) и спомага за точно калибриране на позицията и аспекта на специфичните линии, за да осигури тълкуване на резултатите от лентите от едно и също прехвърляне (с еднакъв сериен номер).

Nota Bene: Профилът на положителната контрола (R10) може да варира в зависимост от партидата на използваните реагенти. Съответните изображения са достъпни на нашия уебсайт [www.ldbiodiagnostics.com](http://www.ldbiodiagnostics.com) като пример.

### Описание на бандовете

Положителната проба може да покаже множество линии, разположени между 2 и 200 кило далтона (kDa). На практика, а и поради определени причини, за разчитане е избран само диапазон от 6 до 55 kDa.

В тази област най-често са налице 5 линии при следните молекулни тегла (kDa): **6-8, 12, 23-26, 39, 50-55**. Поради това те се наричат: **P6-8, P12, P23-26, P39 и P50-55**



**Фиг. 1:** Пример за положителни и отрицателни резултати

Профилите са дадени като примери. Лентите са маркирани с буквата "Е", специфична за параметъра от партида "04010".

### Описание на бандовете

Ивиците **P6-8** и **P23-26** могат да се появят под формата на голяма единична или двойна ивица. Ивицата **P50-55** традиционно се представя под формата на широка ивица с доста размити контури.

#### Важни точки – В практиката (вж. Фиг. 1):

Зоните 6-26 kDa и 39-55 kDa са най-специфичните и най-лесни за разчитане и тълкуване.

Междинната зона, ограничена от линии P23-26 и P39, не е напълно специфична за цистицеркоза (чести кръстосани реакции, особено с други хелминтиази и *P. falciparum* малария).

### Тълкуване

Наличието на минимум **2 добре изразени банди** от 5 банди, описани по-горе, P6-8, P12, P23-26, P39 и P50-55, е показателно за цистицеркоза в серума и за невроцистицеркоза в ликвор.

Примери от по-горе: "+" = невроцистицеркоза - 8, 14, 11 = хидатидоза 7 = алвеоларна ехинококоза.

**Забележка:** Лента 7 представя неспецифичния аспект "Микадо" (вж. § Отстраняване на неизправности)

За да валидирате резултатите, винаги сравнявайте профила на имуноблота на всяка проба с този на положителната контрола R10. Аспектът на линиите е важен при тълкуване на резултатите.

## ОГРАНИЧЕНИЯ НА УПОТРЕБАТА

- Диагнозата на инфекциозно заболяване не може да бъде установена въз основа на резултата от единичен тест.
- Тези серологични резултати трябва да се тълкуват съобразно наличната информация (епидемиологична, клинична, образна, биологична), за да се установи диагноза. Диагнозата не може да се основава само на тях.

## ХАРАКТЕРИСТИКА (вижте литературни справки)

### Чувствителност

Оценяването обхваща 79 проби (70 серума и 9 ГМТ), които са били положителни съгласно клинични, епидемиологични, радиологични и/или серологични критерии.

77 проби са положителни, включително 9 ГМТ. **Чувствителност Se = 97.5%**

### Специфичност

Оценяването обхваща 95 проби, включително 81 серумни проби от пациенти, страдащи от следните паразитни инфекции: *Toxocara canis* (7), *Trichinella spiralis* (14), *Toxoplasma gondii* (7), *filariasis* (7), *Fasciola hepatica* (4), *Echinococcus granulosus* (14), *E. multilocularis* (14), *Schistosoma* sp. (14) и 14 серума от пациенти, страдащи от автоимунни заболявания: ревматоиден фактор RF+ (7) и анти-ядрени антитела ANA+ (7). Всички проби са отрицателни. **Специфичност Sp = 100%**

Забележка: Някои проби дават изолирани тесни ивици (бандове), които не бива да се бъркат със специфичните бандове (вж. примерите на стр. 5). По-специално, характерният аспект (голям и дифузен) на банд **P50-55** разграничава тесните линии, които понякога се откриват на това ниво в серуми с ехинококоза, хидатидоза или шистозомиаза.

### Заклучение

Връзката между CYSTICERCOSIS WB IgG и клиничния статус е отлична.

**Чувствителност = 97,5% [IC95: 90,3 - 99,6%]**

**Специфичност = 100% [IC95: 95,1 - 100%]**

Доверителните интервали се изчисляват по метода на Уилсън с корекция на непрекъснатостта

### Възпроизводимост

Изследвана е възпроизводимостта между сериите и между партидите. И в двата случая съотношението серум към серум по отношение на специфичните линии е отлично.

### Интерференция/повлияване

Въпреки че не се наблюдава особена кръстосана реакция при хемолизирани, иктерични или липидни серуми, препоръчва се резултатите от такива проби да се тълкуват внимателно.

### Отстраняване на неизправности

**„Бандовете са бледи с малък контраст“:** Някои серуми с ниски концентрации на антитела могат да доведат до такива резултати.

**„Засенчените участъци могат да се видят повече или по-малко оцветени, леко дифузни“:** Лентата не е била напълно потопена в някой от реактивите и не е инкубирана правилно по цялата дължина. Петна могат също да се видят там, където пробата е използвана, ако тавата не е разклатена след нейното поставяне.

**„Фоновият шум (нежелан сигнал) е значителен и прави разчитането много трудно“:** Измиванията са били недостатъчни или последната инкубация е продължила прекалено дълго. Следвайте добрите техники на изпълнение на теста, спазвайте времето за измиване и подбирайте вода с добро качество. Намалете времето на последната инкубация.

По изключение, някои серуми могат да реагират по неспецифичен начин. След това резултатът от имуноблота не може да се използва.



Този неспецифичен фонов шум (нежелан сигнал) може да включва само част от лентата, което прави резултатите неинтерпретируем само за тази част.

**„В разтвор се появява утайка по време на последната стъпка на развитие“:** субстратът може частично да се утаи (черни люспести частици) в буфера в края на развитието. Това явление не променя качеството на развитието, което трябва да продължи нормално. Последното измиване с дестилирана вода елиминира възможните налични твърди частици.

## СПИСЪК С ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Deckers N, et Dorny P. 2010. « Immunodiagnosis of Taenia Solium Taeniosis/cysticercosis ». *Trends in Parasitology* 26 (3): 137-44. doi:10.1016/j.pt.2009.12.008.
- Del Brutto OH. 2012. « Diagnostic Criteria for Neurocysticercosis, Revisited ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 299-304. doi:10.1179/2047773212Y.0000000025.
- Dournon N, Epelboin L, Brion MC, Paris L, Bricaire F, et Caumes E. 2012. « Seroconversion of Neurocysticercosis Occurring After Anti-Helminthic Treatment: Neurocysticercosis With Seroconversion ». *Journal of Travel Medicine* 19 (6): 383-86. doi:10.1111/j.1708-8305.2012.00658.x.
- Garcia HH, Nash TE, et Del Brutto OH. 2014. « Clinical Symptoms, Diagnosis, and Treatment of Neurocysticercosis ». *The Lancet Neurology* 13 (12): 1202-15. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
- Gekeler F, Eichenlaub S, Mendoza EG, Sotelo J, Hoelscher M, et Löscher T. 2002. « Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 21 (3): 227-29. doi:10.1007/s10096-002-0695-3.
- Michelet L, Fleury A, Sciutto E, Kendjo E, Fragoso G, Paris L, et Bouteille B. 2011. « Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid ». *Journal of clinical microbiology* 49 (1): 195-200. doi:10.1128/JCM.01554-10.
- Raccurt CP, Agnamey P, Boncy J, Henrys JH, et Totet A. 2009. « Seroprevalence of human Taenia solium cysticercosis in Haiti ». *Journal of helminthology* 83 (2): 113-16. doi:10.1017/S0022149X09232330.
- Rodriguez S, Wilkins P, et Dorny P. 2012. « Immunological and Molecular Diagnosis of Cysticercosis ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 286-98. doi:10.1179/2047773212Y.0000000048.
- Barbara S, Beović B, Lužnik Z, Skvarč M, et Logar J. 2014. « Evidence of Human Neurocysticercosis in Slovenia ». *Parasitology* 141 (04): 547-53. doi:10.1017/S0031182013001947.
- Van Doorn RH, Wentink-Bonnema E, Rentenaar RJ, et Van Gool T. 2007. « Specific Cross-Reactivity in Sera from Cystic Echinococcosis Patients in an Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot for Cysticercosis Diagnostics ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101 (9): 948-50. doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.021.

### известие за актуализация - моля, прочетете внимателно

Дата на издаване	Дата на издаване	Дата на издаване
06/08/2021	Vs 19	Премахване на предупреждението за безопасност R5 - Нощно инкубационно време - Електронен адрес за контакт – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs20	Нов адрес
05/04/2023	Vs21	R6 без NaN3. Ивица, обозначена с буква. Възможно е използване на реактиви от различни партиди.



NF EN ISO 13485

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](mailto:info@ldbiodiag.com)