

FASCIOLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro диагностичен имуноблот тест
Полуавтоматизирана / ръчна техника

#FAS ES-WB24G: 24 теста

#FAS ES-WB12G: 12 теста

#FAS ES-WB96G: 96 теста

Инструкции за употреба

Намерете повече информация и инструкции за употреба на вашия език на нашия
уебсайт www.ldbiodiagnostics.com

Предназначение

FASCIOLA ES Western Blot IgG е качествен тест за еднократна употреба за серологична диагностика на ИгГ антитела чрез имуноблот анализ при фасциолоза, предназначен за потвърждаващо изследване на положителен или двусмислен (граничен) резултат, получен чрез класически скринингови тестове.

Принцип на теста

Уестърн блот техника

Екскреторно-секреторни (ES) антигени от *Fasciola hepatica*, 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 от серум, която ще се тества, се инкубира отделно с тест-лента. Специфичните антитела, потенциално налични в пробата, селективно се свързват към антигените. Алкалнио-фосфатазият анти-човешки IgG конюгат след това се свързва към свързаните антитела. Накрая, имунокомплексите реагират със субстрата. Антигените, разпознати от антителата от тип IgG, присъстващи в пробите, се разкриват като лилави напречни линии.

Реактиви, доставени с кита

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

в курсив: опаковка от 12 теста (#FAS ES-WB12G) – в **подчертан шрифт**: опаковка от **96 теста (#FAS ES-WB96G)**

Идентификация	Колво	Описание	Състав
R1	1	Папка(и) с 24 (12, 4x24) ЛЕНТИ: предварително нарязани + оцветени стандарти. (Всяка папка и всеки трансфер се идентифицира с уникален сериен номер)	Сенсибилизирана нитроцелулоза. Цветно 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, 125) ml БУФЕР ЗА ПРОБИ (Готов за употреба – розов разтвор).	Буфер + сърфактант.
R3	1	Флакон(и) с 30 (30, 2x60) ml АНТИ IgG КОНЮГАТ (Готов за употреба – син разтвор).	Буфер + анти-човешки IgG поликлонален кози серум, конюгиран с алкална фосфатаза + NaN ₃ (<0.1%) + стабилизатори.
R5	1	Флакон с 30 (30, 125) ml СУБСТРАТ (Готов за употреба – непрозрачен кафяв флакон).	Буфер + NBT + BCIP + стабилизатори.
R6	1	Флакон с 60 (60, 250) ml ИЗМИВАЩ КОНЦЕНТРАТ 10X БУФЕР (<u>Да се разреди 1:10</u> с дестилирана вода – безцветен разтвор).	Буфер + сърфактант.
R10	1	Туба с 100 (100, 2x100) µl ПОЗИТИВЕН КОНТРОЛЕН СЕРУМ (Готов за употреба – червена капачка).	Буфер + пул с човешки серум, позитивен за <i>Fasciola</i> + NaN ₃ (<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 (NaN3): 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

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 10 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 за 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 10 µl серум.

До започване на работа, съхранявайте пробите при температура от +2 до +8°C. Ако пробите трябва да се съхранявае повече от седмица, 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 теста, в чиста бутилка се разреждат 10 ml измиващ концентрат 10X (**R6**) в 90 ml дестилирана или дейонизирана вода. Внимавайте добре да разбъркате 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 С+ 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 линии. С+ лента не може да се използва за тълкуване на резултатите от ленти от блот с различен сериен номер.

2. Нарезете 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 минута, като номерът трябва да е видим отгоре и внимателно разклащайте подноса, за да се потопят изцяло в буфера.
5. Разпределете пробите и положителните контроли: в съответствие с плана, при количество 10µL на канал. Леко разклатете подноса след всяко накапване. **Инкубирайте за 90 минута ± 5 минута** при температура 20-26°C.
6. Етап промиване: Изпразнете съдържанието на каналите с Пастъорова пипета 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 разместват по време на тази процедура.
7. Накапете 1.2 mL от анти IgG конюгат (R3) във всеки канал. Поставете подноса за инкубиране върху люлеещата се платформа.
Инкубирайте 60 минута ± 5 минута при температура 20-26°C
8. Етап на промиване: повторете стъпка 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 минута ± 5 минута** 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 лентите ще станат по-светли, когато изсъхнат.

10. Стопирайте реакцията чрез аспириране на субстрата с Пастърова пипетаг 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 стрипчетата: Докато каналите са все още пълни с вода, вземете тест-лентите с пинсета, захванати 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 посветъл, 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).

Контрол на качеството и тълкуване на резултатите

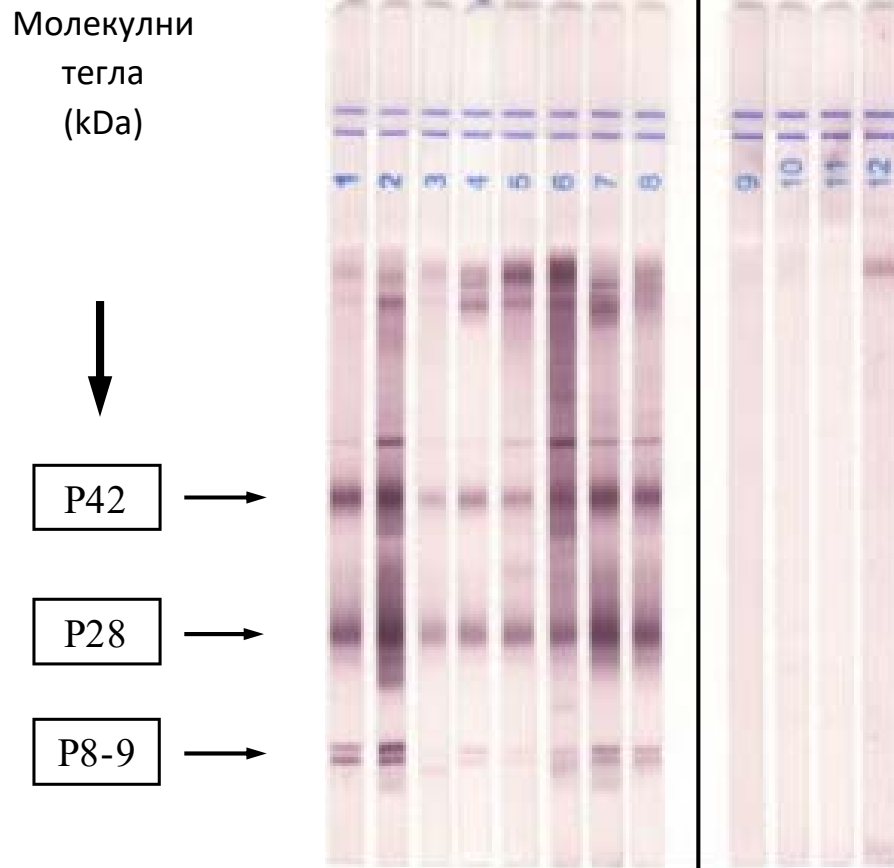
Серумната контрола (R10), предоставена с кита, трябва систематично да се включва във всяка серия имуноблот. Тя показва типичния профил и дава възможност за техническо валидиране на доброто протичане на теста (линиите трябва да се появяват много ясно върху лентата) и спомага за точно калибриране на позицията 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 като пример.

Описание на бандовете:

Положителната проба може да покаже множество линии, разположени между 120 и 7 килодалтона (kDa).

Сред повече или по-малко маркирани бандови ивици, които могат да бъдат намерени в тази област, три от тях са специално подбрани заради тяхната специфичност, чувствителност и лекота на отчитане: двойна линия при 8-9 kDa, голяма линия при 28 kDa с тясна ивица при 25 kDa) и голям банд при 42 kDa. Поради това те се наричат: **P8-9, P28 и P42**.



Фиг. 1: Пример за положителни и отрицателни резултати

Профилите са дадени като примери. Лентите са маркирани с буквата "Н", специфична за параметъра от партида "07012".

Тълкуване:

Едновременното присъствие на две линии между **P8-9**, **P28** и **P42** и включването на P28 е показателно за фасциолоза.

ПОЛОЖИТЕЛНИТЕ бандови линии по-горе показват различни примери на откритите специфични профили.

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 списък с използвана литература)

Оценката на работните характеристики на кита **FASCIOLA ES WB IgG** (*Fasciola hepatica* - **ES антиген**) е изпълнена и е сравнена с предишната версия на кита на LDBIO за диагностика FASCIOLA WB IgG C (*Fasciola hepatica* – **Общ антиген**), посочен по-долу: Референтен уестърн блот, на пазара от 2004 г.

Чувствителност (Se):

Изследваната проба съответства на 75 серума от пациенти с предполагаема клинична фасциолоза. Тези 75 серума са изследвани паралелно с **FASCIOLA ES WB IgG** и Референтен уестърн блот.

бр. = 75	РЕФЕРЕНТЕН WB	FAS E/S WB IgG
ПОЛОЖИТЕЛЕН	75	75
ОТРИЦАТЕЛЕН	0	0

Таблица 1: Корелация **FASCIOLA ES WB IgG / WB REFERENCE** Корелацията е отлична (Se=100%)

Естество на специфичните линии (Kda)	P8-9	P28	P42
Честота %	65.3	100.0	100.0

Таблица 2: Честота на присъствието на всяка от специфичните линии, наблюдавани върху имуноблотите по време на нашето изследване с 75 положителни проби.

Специфичност:

151 серума от пациенти с паразитни и гъбични инфекции, автоимунни заболявания и кръвни донори са изследвани с **FASCIOLA ES WB IgG**: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cysticercosis) (14), *Entamoeba histolytica*, *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), малария (7), *Candida spp* (7), RF + Ревматоиден фактор (7), ANA + Анти-нуклеарни антитела (7) кръводарители (53).

Специфичността на линиите P8-9, P28 и P42 от ES антиген е 100%. Линиите, извън този обхват, не могат да се смятат за специфични.

Заклучение

Съответствието между двете техники е перфектно.

В сравнение с референтната WB, комплектът FASCIOLA ES WB IgG дава следните изпълнения:

Se = 100% [IC95 93,9 - 100%]

Sp = 100% [IC95 96,9 - 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.

Интерференции

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. Оцветяването на фона може понякога да изглежда като ивици (аспект „Микадо“, вж. примера, Фиг. 1, лента № 7), което прави разчитането на имуноблот много трудно. След това резултатът от имуноблота не може да се използва.

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

„В разтвора 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

- Agnamey, 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.

ИЗВЕСТИЕ ЗА АКТУАЛИЗАЦИЯ - моля, прочетете внимателно

ДАТА НА ИЗДАВАНЕ	ВЕРСИЯ	ОБОБЩЕНИЕ НА МОДИФИКАЦИЯТА
11/08/2021	Vs 17	Премахване на предупреждението за сигурност R5 - Имейл адрес за контакт – NaN3 EUN 032.
30/11/2022	Vs18	Нов адрес
16/01/2023	Vs19	R6 без NaN3. Ивица, обозначена с буква. Възможно е използване на реактиви от различни партии.



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 – info@ldbiodiag.com