

FASCIOLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatizirana / ručna metoda

#FAS ES-WB24G: 24 testova

#FAS ES-WB12G: 12 testova

#FAS ES-WB96G: 96 testova

UPUTE ZA UPOTREBU

Više informacija i Upute za upotrebu na vašem jeziku potražite na našoj web stranici
www.ldbiodiagnostics.com

NAMJENA

FASCIOLA ES Western Blot (WB) IgG je jednokratna upotreba kvalitativni test serološkog dijagnostičkog testa IgG imunoblot-testa fascioleze namijenjenog za potvrdno ispitivanje pozitivnog ili dvosmislenog rezultata dobivenog klasičnim testovima probira.

PRINCIP TESTA

Western Blot tehnika

Izlučujući / sekretorni (ES) antigeni *Fasciola hepatica*, jednom odvojeni elektroforezom, vezani su elektroblotom na površinu nitrocelulozne membrane (koja se naziva prijenos) izrezana na 24 trake označene brojevima od 1 do 24.

Provođenje ispitivanja

Svaki uzorak koji se ispituje odvojeno je inkubiran s trakom. Specifična antitijela koja su potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vežu na antigene. Alkalna fosfataza-anti-ljudski IgG konjugat se zatim veže na vezana antitijela. Konačno, imunokompleksi reagiraju s supstratom. Antigeni koje prepoznaju specifična antitijela tipa IgG prisutna u uzorcima se prikazuju kao ljubičaste transverzalne trake.

REAGENSI UKLJUCENI U KIT

Normalan: pakiranje od 24 testova (#FAS ES-WB24G)

italic: pakiranje od 12 testova (#FAS ES-WB12G) - **bold**: Pakiranje od 96 testova (#FAS ES-WB96G).

ID	Kol.	Opis	Sastav
R1	1	Mape od 24 (<i>12</i> , 4x24) STRIPOVI: standardni + obojani standardi. (Svaka mapa i svaki prijenos identificira se jedinstvenim serijskim brojem)	Senzitizirana nitroceluloza. Molekularna težina u boji (kDa): Plava: 250, plava: 150, plava: 100, ružičasta: 75, plava: 50, zelena: 37, ružičasta: 25, plava: 20, plava: 15, žuta: 10.
R2	1	Bočica od 30 (<i>30</i> , 125) ml PUFERA ZA UZORAK (spremna za upotrebu - ružičasta otopina).	Pufer + surfaktant.
R3	1	Bočica (e) od 30 (<i>30</i> , 2x60) ml ANTI IgG KONJUGAT (spremna za upotrebu - plava otopina).	Pufer + anti-humani IgG poliklonalni kozji serum konjugiran s alkalnom fosfatazom + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizatori.
R5	1	Bočica od 30 (<i>30</i> , 125) ml SUBSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (<i>60</i> , 250) ml WASH CONCENTRATE 10X PUFER (Razrijediti 10 puta u destiliranoj vodi - bezbojna otopina).	Pufer + surfactant.
R10	1	Epruveta od 100 (<i>100</i> , 2x100) µl POZITIVNOG KONTROLNOG SERUMA (Spreman za uporabu - crvena kapa).	Pufer + bazen humanog seruma pozitivan u <i>Fasciola</i> serologiji + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.

R1: Slovo prije svakog broja trake specifično je za parametar.

R2, R3, R5 i R6 zajednički su za sve kitove i imaju jedinstveni serijski broj koji ovisi samo o datumu njihove proizvodnje. **Preporučuje se provođenje višeparametarskog ispitivanja (vidi LDBIO raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.**

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - U dodiru s kiselinama oslobađa vrlo otrovni plin.

EUH 210 Sigurnosno-tehnički list dostupan na zahtjev i na našoj web stranici www.ldbiodiagnostics.com.

POTREBNI DODATNI MATERIAL KOJI NIJE UKLJUCEN

- Višekanalne polipropilenske inkubacijske posude za mini-mrlje (# WBPP-08 ili ekvivalent).
- Platforma za ljuljanje za imunoblokove, vakuumski sustav za tekućine (kade # WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Cijevi i materijal za crtanje uzoraka, stupnjeviti cilindri, prilagođeni spremnici. Automatske pipete, mikropipete i vrhovi za jednokratnu uporabu (volumeni od 10 µl, 1,2 ml i 2 ml).
- Destilirana ili deionizirana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna ljepljiva traka.
- Rukavice, pincete za rukovanje trakama, rezačem ili skalpelom, ravnim transparentnim ravnilom.

Napomena: Naši reagensi mogu se koristiti u automatiziranom imunoblot procesoru. **Treba paziti na moguće kemijske kontaminacije naših reagensa ako se procesor dijeli s reagensima drugog proizvođača** (poznati primjer: kontaminacija TWEEN-om 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervirajte bočice za procesor. Nakon obrade ne stavljajte preostale korištene reagense natrag u originalne bočice.

SKLADISTENJE I STABILNOST

Skladištiti između 2 i 8 ° C. Reagensi iz kita stabilni su do isteka roka valjanosti naznačenog na vanjskoj kutiji i naljepnicama bočice. Ne koristite kontaminirani ili mutni reagens. Pufer za ispiranje razrijeđen do 1/10 stabilan je 2 mjeseca na +2 do +8 ° C i jedan tjedan na sobnoj temperaturi.

MJERE OPREZA PRILIKOM UPOTREBE

Sigurnost

- Samo za *in vitro* uporabu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički osposobljeno osoblje. Rukovati u skladu s dobrom laboratorijskom praksom i smatrati svaki reagens i bilo koji uzorak potencijalno toksičnim i / ili zaraznim.
- Nosite laboratorijsku odjeću, rukavice i naočale; nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriju. Ne stavljajte pipete u usta.
- Pozitivna kontrola je serum ljudskog podrijetla koji je inaktiviran za viruse HIV 1 i 2, hepatitis B i hepatitis C. Njime se mora rukovati kao s potencijalno zaraznim proizvodom.
- Supstrat sadrži mješavinu NBT-a i BCIP-a, toksičnog za kontakt (koža i sluznice) i inhalacija.
- Reagensi sadrže natrijev azid koji može tvoriti eksplozivne metalne soli s olovom i bakrom. Isprati prosuto vodom.
- Odložite otpad (uzorke, vrhove, epruvete, tekućinu za pranje, korišteni reagens...) u skladu s dobrom praksom u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljni incident mora biti predmet prijave proizvođača i nadležnog tijela.

Mjere opreza

- Očitajte i protumačite rezultate pod izravnim bijelim svjetlom.
- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, osigurati sljedivost.

- Koristite trake u brojčanom redosljedu. Nemojte miješati trake s različitim serijskim brojevima; koristiti prijenose uzastopce. Uspostavite poseban plan distribucije prije početka ispitivanja.
- Nemojte dodirivati trake prstima; koristite pincete.
- Reagensi se prije uporabe moraju dobro izmiješati, osobito koncentrirani pufer za ispiranje.
- Nakon upotrebe zatvorite bočice; nemojte koristiti ako je tvar slučajno uvedena u reagense. Ne koristite reagens iz bočice koja pokazuje znakove curenja. Nemojte koristiti mutnu ili istaloženu otopinu.
- Koristite samo vrhove pipeta za jednokratnu uporabu. Izbjegavajte kontaminaciju među kanalima. Pazite na stvaranje pjene ili mjehurića u vrhovima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica s reagensima).
- Inkubacijske posude čistite samo destiliranom vodom (nikada nemojte koristiti deterdžent ili izbjeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili raspodjela neadekvatne količine može dovesti do negativan ili pozitivan testa, bez obzira na njegov stvarni status.

UZORKOVANJE

Aseptički skupite uzorke u suhe epruvete. Potrebno je najmanje 10 µl seruma.

Skladištite uzorke na 2-8 ° C dok se ne obrade. Ako moraju biti skladišteni duže od tjedan dana, potrebno je smrznuti uzorke na -20 ± 5 ° C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbjegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije primijećena posebna unakrsna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipemičnim serumima, preporuča se pažljivo tumačiti rezultate korištenja takvih uzoraka.

PRIPREMA REAGENSA

Pufer za ispiranje: Za 4 testa, u čistoj bočici, razrijedite 10 ml koncentrata za pranje 10X (R6) u 90 ml destilirane ili deionizirane vode. Pazite da dobro promiješate razrijeđeni pufer.

POSTUPAK

Napomena: Preporučuje se provođenje višeparametarskog ispitivanja (vidi LDBIO raspon imunoblotova) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i kako bi se osigurala bolja kontrola kvalitete.

1. Pripremite plan raspodjele uzoraka i C + pozitivnu kontrolu (R10).

Samo uporabom ove kontrole može se tehnički potvrditi ispitivanje i utvrditi za dani serijski broj, razvijene specifične trake. C + traka se ne može koristiti za interpretaciju rezultata traka iz mrlje drugog serijskog broja.

2. Izrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suhog ravnog prozirnog ravnala, držeći plavu crtu za pozicioniranje na trakama: držite trake čvrsto na mjestu s ravnilom i izrežite ih na strani naprezanja (brojevi su vidljivi kroz ravnalo).
3. Ispipetirajte 1,2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu prema utvrđenom planu.
4. U brojčanom redosljedu položite numerirane trake u kanale: pustite da se trake rehidriraju na površini pufera približno 2 minute s brojem vidljivim na vrhu, a ZATIM lagano protresite pladanj da biste ga u potpunosti uronili.
5. Podijelite uzorke i pozitivnu (e) kontrolu (e): prema planu distribucije, brzinom od 10 µl po kanalu. Nježno protresite posudu nakon svakog doziranja. Stavite podložak na platformu za ljuhanje. **Inkubirajte 90 min ± 5 min na 20-26 ° C.**
6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala pomoću Pasteurove pipete ili okrećite ladicu za inkubaciju. U svaki kanal dodajte 2 do 3 ml razrijeđenog pufera za ispiranje. Inkubirajte na platformi za ljuhanje 3

minute. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Osigurajte da se trake ne okreću tijekom ovih koraka.

7. Ispipetirajte 1.2 ml anti-IgG konjugata (R3) u svaki kanal. Postavite pliticu na platformu za ljuhanje. **Inkubirajte 60 min** \pm 5 min na 20-26 ° C
8. Korak ispiranja: ponoviti korak 6
9. Ispipetirajte 1.2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Stavite na platformu za ljuhanje i zaštitite je od izravnog svjetla. **Inkubirajte 60 min** \pm 5 min na 20-26 ° C.

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do točke gdje je čitanje teško (kvaliteta koraka ispiranja ima temeljni utjecaj na boju pozadine). Imajte na umu da će se trake osvijetljivati dok se suše.

10. Zaustavite reakciju ispiranjem supstrata s Pasteurovom pipetom ili okretanjem inkubacijske posude i ispuštanjem 2 ml destilirane vode u kanale. Ponovite ovaj zadnji korak pranja još jednom.
11. Sušenje trakica: Dok su kanali još uvijek napunjeni vodom, pomoću pinceta izvadite trake na numeriranom kraju i pohranite ih, s vidljivim brojem na Whatmanov upijajući papir. Neka se osuši na zraku. Boja traka prirodno će se olakšati tijekom sušenja. Tumačenje se mora obaviti samo nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Trake prenesite na list papira koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte linije pozicioniranja. Držeći ih na mjestu s ravnalom zalijepite vrh traka transparentnom ljepljivom trakom.

Za dobru interpretaciju trake moraju biti poredane po prijenosu i numeričkim redoslijedom, razmaknute u razmaku od najviše nekoliko milimetara. Nije pouzdano uspoređivati trake koje su udaljene jedna od druge (npr. Br.2 s br. 15). **Opasno je** (lažni rezultati) usporediti trake od različitih

KONTROLA KVALITETE I INTERPRETACIJA

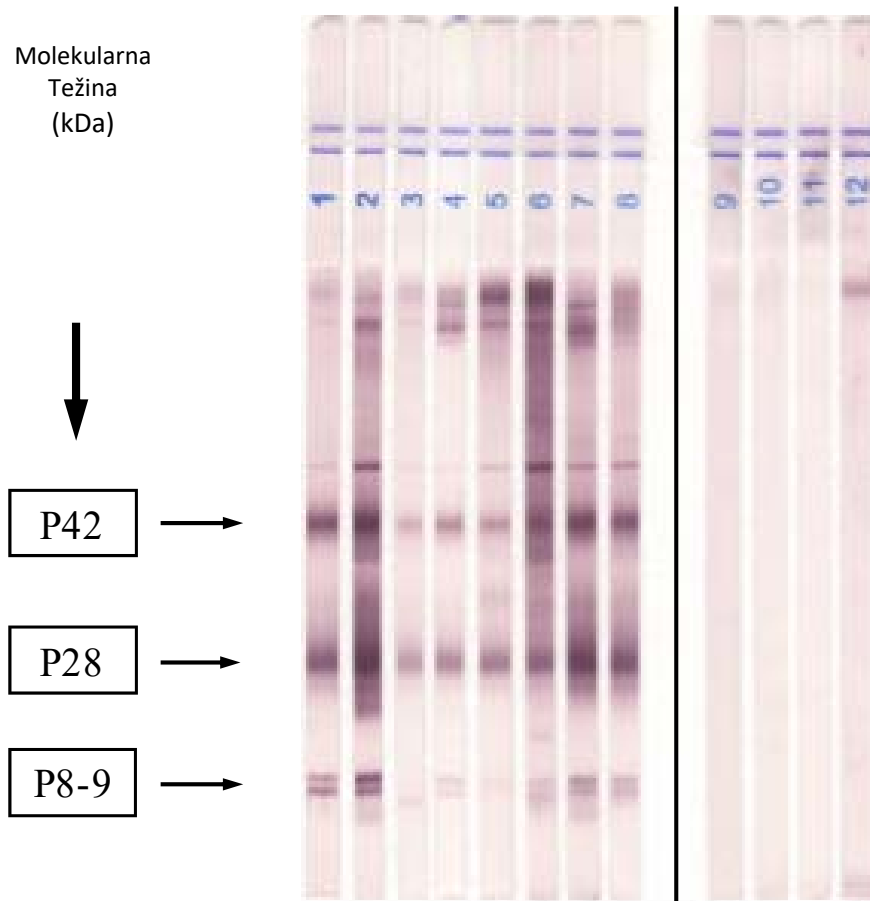
Kontrola seruma (R10) iz kita se mora sustavno uključiti u bilo koju seriju imunoblotova. Prikazuje tipičan profil i omogućuje tehničku validaciju dobrog vođenja testa (trake moraju biti vrlo jasno prikazane na traci) i precizno kalibrirati položaj i aspekt specifičnih traka kako bi se omogućilo tumačenje rezultata traka od isti prijenos (isti serijski broj).

Nota Bene: Profil pozitivne kontrole (R10) može se razlikovati ovisno o broju serije korištenih reagensa. Odgovarajuće slike dostupne su na našoj web stranici www.ldbiodiagnostics.com kao primjer.

Opis traka

Pozitivni uzorak može predstavljati brojne trake smještene između 120 i 7 kDa.

Među više ili manje označenim trakama koje se mogu naći na ovom području, 3 su posebno odabrane zbog njihove specifičnosti, njihove osjetljivosti i lakoće čitanja: dublet na 8-9 kDa, veliki pojas na 28 kDa (često povezan s uskim pojasom na 25 kDa) i velikim pojasom na 42 kDa. Oni se stoga nazivaju: **P8-9, P28 i P42.**



Slika 1: Primjeri pozitivnih i negativnih rezultata

Profili su dati kao primjeri. Trake su označene slovom "H" specifičnim za parametar iz serije "07012".

Interpretacija

Istodobna prisutnost dviju traka između **P8-9**, **P28** i **P42** i uključivanje **P28** je indikativno za fasciolozu. "POZITIVNE" trake iznad prikazuju različite primjere pronađenih profila.

Da bi se potvrdili rezultati potrebno je usporediti profil imunoblot-a svakog uzorka s profilom pozitivne kontrole R10. Izgled traka je važan pri tumačenju testa.

OGRANICENJA

- Dijagnoza zarazne bolesti se ne može utvrditi na temelju jednog rezultata testa.
- Serološki rezultati se moraju tumačiti u skladu s dostupnim informacijama kako bi se uspostavila dijagnoza (npr. epidemiologija, klinička slika, slika, biologija itd.). Ne smiju se koristiti za postavljanje dijagnoze samo na temelju njihove pozitivnosti.

IZVEDBA (vidi reference iz literature)

Provedena je procjena učinkovitosti kita **FASCIOLA ES WB IgG** (Fasciola hepatica - **ES antigena**) i uspoređena je prethodna verzija LDBIO dijagnostičkog kita FASCIOLA WB IgG (Fasciola hepatica - **Total Antigen**) označenog u daljnjem tekstu: REFERENCA WB od 2004.

Osjetljivost (Se)

Ispitivani uzorak odgovara 75 seruma bolesnika sa sumnjom na kliničku fasciolizu. Ovih 75 seruma testirano je paralelno s **FASCIOLA ES WB IgG** i REFERENTNIM WB.

n=75	REFERENCA WB	FAS ES WB IgG
POZITIVNO	75	75
NEGATIVNO	0	0

Tablica 1: Korelacija **FASCIOLA ES WB IgG / WB REFERENCA** Korelacija je odlična ($Se=100\%$)

Priroda specifičnih traka (Kda)	P8-9	P28	P42
Frekvencija %	65.3	100.0	100.0

Tablica 2: Učestalost prisutnosti svakog od specifičnih traka opaženih na imunoblotima tijekom našeg istraživanja na 75 pozitivnih uzoraka.

Specifičnost

151 seruma parazitskih i gljivičnih infekcija, autoimunih bolesti i darivatelja krvi testirano je **FASCIOLA ES WB IgG**: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cisticercosis) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Schistosoma* spp (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malarija (7), *Candida* spp (7), RF + reumatoidni faktor (7), ANA + Anti-nuklearna antitijela (7) darivatelja krvi (53).

Specifičnost traka P8-9, P28 i P42 od ES antigena je 100%. Trake izvan tog raspona ne smatraju se specifičnim.

Zaključak

Korespondencija dviju tehnika je savršena.

U usporedbi s referentnom WB, FASCIOLA ES WB IgG WB komplet imao je sljedeće izvedbe:

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

Sp = 100% [IC95 96,9 - 100%]

Intervali pouzdanosti izračunavaju se prema Wilsonovoj metodi s korekcijom kontinuiteta.

Reproducibilnost

Ispitana je inter-serijska i inter-lot reproduktivnost. U oba slučaja, korelacija seruma i seruma s obzirom na specifične vrpce je odlična.

Interferencije

Iako nije zabilježena posebna križna reakcija s hemoliziranim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporuča se pažljivo interpretirati rezultate korištenja takvih uzoraka.

RJESAVANJE PROBLEMA

"Trake su blijede s malo kontrasta": Određeni serumi s niskim koncentracijama antitijela mogu dati takve rezultate.

"Vide se zasjenjena područja, više ili manje obojena, malo difuzna": Traka nije potpuno potopljena u jedan od reagensa i nije se pravilno inkubirala duž cijele dužine. Mrlje mogu također biti prisutne tamo gdje je uzorak bio odložen, ako se pladanj nije protresao nakon točenja.

" Pozadinska buka je značajna, što otežava čitanje ": Ispiranje je bilo nedovoljno ili je posljednja inkubacija bila predugačka. Osigurati dobre tehnike ispitivanja, poštivati vrijeme ispiranja i osigurati kvalitetu vode. Smanjiti vrijeme posljednje inkubacije.

Iznimno, određeni serumi mogu reagirati na nespecifičan način. Tada se rezultat imunoblota ne može koristiti. Ova nespecifična pozadinska buka može uključivati samo dio trake, što rezultate čini nerazumljivim samo za taj dio.

"U posljednjem stupnju razvoja pojavljuje se talog u otopini": supstrat može u stvari djelomično precipitirati (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne mijenja kvalitetu razvoja koji se mora normalno nastaviti. Posljednje ispiranje destiliranom vodom eliminira moguće krute čestice.

LITERATURA

- 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.

OBAVIJEST O AŽURIRANJU - Pažljivo pročitajte

DATUM IZLASKA	VERZIJA	SAŽETAK MODIFIKACIJE
11/08/2021	Vs 17	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - Kontakt adresa e-pošte – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs18	Nova adresa
16/01/2023	Vs19	R6 bez NaN3. Traka označena slovom. Moguća uporaba reagensa iz različitih serija.



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