

CYSTICERCOSIS

CE



Western Blot IgG

In vitro diagnostický test Immunoblot
Poloautomatická / manuální technika

#CYS-WB24G: 24 testů

#CYS-WB12G: 12 testů

#CYS-WB96G: 96 testů

INSTRUKCE NA POUŽITÍ

Další informace a pokyny k použití ve vašem jazyce naleznete na našich webových stránkách
www.ldbiodiagnostics.com

ÚČEL POUZITÍ

CYSTICERCOSIS IgG Western Blot (WB) je kvalitativní test na jedno použití pro sérologickou diagnostiku IgG pomocí imunoblotu pro cysticerkózu. Je určen jako konfirmační test pro pozitivní nebo hraniční výsledek získaný klasickými screeningovými testy. Lze ho provádět na séru nebo na cerebrospinální tekutině (CSF).

PRINCIP TESTU

Western Blot technika

Antigeny (extrahované z cyst *Taenia solium* u vepřů) se po separaci elektroforézou vážou na povrch nitrocelulóзовé membrány elektroblotací (tzv. transfer). Ta se rozstříhá na 24 stripů označených 1 až 24.

Provedení testu

Každý vzorek na testování se odděleně inkubuje se stripem. Specifické protilátky, které jsou potenciálně přítomny ve vzorku, se selektivně vážou na antigeny. Konjugát alkalické fosfatázy a protilidského IgG se pak váže na navázané protilátky. Nakonec imunokomplexy reagují se substrátem. Antigeny se rozlišují specifickými protilátkami typu IgG, přítomnými ve vzorku, jako příčný purpurový proužek.

REAGENCIE DODANÉ V KITU

Výchozí: balení 24 testů (#CYS-WB24G)

kurzíva: pro balení 12 testů (#CYS-WB12G) - tučně: balení 96 testů (#CYS-WB96G).

ID	Ks	Popis	Složení
R1	1	Obal obsahující 24 (12, 4x24) STRIPŮ: nastříhaných + zbarvených Standardů. (Každý obal a každý transfer je identifikován unikátním výrobním číslem).	Senzitizovaná nitrocelulóza. Zbarvení molekulových hmotností (kDa): modrá:250, modrá:150, modrá:100, růžová:75, modrá:50, zelená:37, růžová: 25, modrá: 20, modrá:15, žlutá:10.
R2	1	Lahvička obsahující 30ml (30, 125) ŘEDIDLO NA VZOREK, (K přímému použití - růžový roztok)	Pufr + surfaktant + NaN3 (<0.1%)
R3	1	Lahvička 30ml (30, 2x60) ANTI IgG KONJUGÁTU, (K přímému použití - modrý roztok.)	Pufr + polyklonální kozí sérum proti lidským IgG konjugované s alkalickou fosfatázou + NaN3 (<0.1%) + stabilizátory.
R5	1	Lahvička 30ml (30, 125) SUBSTRÁTU, (K přímému použití – hnědá lahvička)	Pufr + NBT + BCIP + stabilizátory
R6	1	Lahvička 60ml (60, 250) PROMÝVACÍHO PUFRU 10X KONCENTRÁT (Musí být zředěn v poměru 1:10 destilovanou vodou – bezbarvý roztok).	Pufr + surfaktant.
R10	1	Zkumavka s 200μl (200, 2x200) POZITIVNÍ KONTROLNÍ SÉRUM (K přímému použití – červený uzávěr)	Pufr + sdružené lidské sérum, sérologicky pozitivní na cysticerkózu + NaN3 (<0.1%) + stabilizátory

R1: Písmeno před každým číslem proužku je specifické pro daný parametr.

R2, R3, R5 a R6 jsou stejné ve všech kitech a mají unikátní číslo šarže podle svého data výroby. **Je doporučeno provádět multiparametrové testování (viz další kity LDBIO), aby se omezil počet otevření lahviček a lépe se dodrželo řízení kvality.**

R10 je kalibrován v imunoblotu podle referenční šarže a je určen pouze pro tuto techniku.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

EUH 210 Bezpečnostní list EUH 210 je k dispozici na vyžádání a také na našich webových stránkách www.ldbiodiagnostics.com.

DALSI NEDODANY NUTNY MATERIAL

- Multikanálové polypropylénové inkubační vaničky pro minibloty (# WBPP- 08 nebo obdobné).
- Třepačka pro imunobloty, vakuový systém pro tekutiny (vaničky # WBPP- 08, které dodáváme, lze vyprázdnit jejich jednoduchým otočením).
- Zkumavky a materiál na odběr vzorků, odměrné válce, kontejnery.
Automatické pipety, mikropipety a jednorázové špičky (objemy 25µl, 1.2 ml a 2 ml).
- Destilovaná nebo deionizovaná voda. Absorbční papír (např. filtrační papír Whatman), průhledná lepicí páska.
- Rukavice, pinzety na uchopení stripů, řezátko nebo skalpel, rovné průhledné pravítko.

Pozn.: Naše reagentie lze použít s automatizovaným procesorem imunoblotů. **Dbejte, aby nedošlo k chemické kontaminaci našich reagentií, pokud ho používáte i s reagentiemi jiných výrobců** (známý příklad: kontaminace TWEEN 20), a k bakteriální kontaminaci. Vyhradte si lahvičky pro procesor. Po zpracování nevracejte zbytek reagentií zpět do originálních lahviček.

UCHOVAVANI A STABILITA

Uchovávejte mezi 2 a 8°C. Reagentie z kitu jsou stabilní do data expirace uvedeného na vnějším obalu a na štítcích lahviček. Nepoužívejte kontaminované nebo zakalené činidlo. Promývací pufr naředěný 1/10 je stabilní po 2 měsíce při +2 až +8 °C a jeden týden za pokojové teploty.

UPOZORNENI PRO POUZITI

Bezpečnost

- Pouze pro *in vitro* použití. Pouze pro profesionální použití. Pouze pro technicky vyškolený personál. Pracujte podle zásad správné laboratorní praxe a považujte každou reagensii a vzorek za potenciálně toxický a/nebo infekční.
- Používejte laboratorní plášť, rukavice a brýle; nepijte, nejezte nebo nekuřte v laboratoři. Nepipetujte ústy.
- Pozitivní kontrolou je sérum lidského původu, které bylo inaktivováno pro viry HIV 1 a 2, hepatitidu B a hepatitidu C. Nicméně, je třeba s ním nakládat jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Substrát obsahuje směs NBT a BCIP, které jsou toxické při kontaktu (pokožka a sliznice) a při inhalaci.
- Reagensie obsahují azid sodný, který může tvořit explozivní soli kovů s olovem a mědí. Při vylití oplachujte vodou.
- Odpad likvidujte (vzorky, špičky, zkumavky, promývací tekutinu, použité reagensie...) podle zásad správné laboratorní praxe, platných v současnosti ve vaší zemi.
- Jakýkoli závažný incident musí být předmětem ohlášení výrobcí a příslušnému orgánu.

Upozornění

- Odečtěte a interpretujte výsledky pod přímým bílým světlem.
- Je vhodnější použít všechna činidla ze stejné šarže. Pokud se používají různé šarže, zajistěte sledovatelnost.
- Stripy používejte podle stoupajících čísel. Nemíchete stripy různých sériových čísel, řiďte se podle posloupností transferů. Zaveďte si specifický distribuční plán před započítáním testu.
- Nedotýkejte se stripů prsty; použijte pinzety.
- Reagensie musí být před použitím dobře promíchány, zejména koncentrovaný promývací pufr.
- Po použití uzavřete lahvičky; nepoužívejte je, pokud se reagensie znečistí. Nepoužívejte reagensie z lahvičky, která teče. Nepoužívejte zakalené nebo vysrážené roztoky.
- Používejte pouze jednorázové pipetovací špičky. Vyvarujte se kontaminace mezi žlábký. Sledujte tvorbu pěny nebo bublin v pipetovací špičce (bakteriální kontaminace lahvičky s reagensií).
- Inkubační vaničku očistěte pouze čistou vodou a pak destilovanou vodou (nikdy nepoužívejte detergent nebo chlornan).
- Pokud zapomenete vzorek napipetovat nebo dáte nesprávný objem, může vyjít negativní nebo pozitivní, bez ohledu na jeho skutečný stav.

ODBER VZORKU

Vzorky séra odebírejte asepticky do suchých zkumavek. Pro testování je požadováno minimum 25 µl séra nebo CSF. V případě CSF použití 50µl zvýší citlivost testu.

Uchovejte vzorky při teplotě 2-8°C až do testování. Při delším uchovávání vzorky zmrazte na -20°C±5°C. Nepoužívejte kontaminované vzorky. Zabraňte opakovanému zmrazení a rozmrazení.

I když u hemolyzovaných, ikterických nebo lipemických sér nebyla pozorována žádná zvláštní zkřížená reakce, doporučuje se výsledky použití těchto vzorků interpretovat opatrně.

PRIPRAVA REAGENCIÍ

Promývací roztok: Na 4 testy naředte do čisté nádoby 10 ml z lahvičky Wash Concentrate 10X (R6) v 90 ml destilované nebo deionizované vody. Zředěný pufr pečlivě promíchejte.

POSTUP TESTU

Poznámka: Je doporučeno provádět multiparametrové testování (viz škála kitů LDBIO), aby se omezil počet otevření lahvičky a zabezpečila se kontrola kvality.

1. Připravte si distribuční plán pro vzorky a C+ pozitivní kontrolu (**R10**).

Pouze při použití této kontroly lze test technicky validovat a identifikovat, v rámci dané výrobní šarže, podle specificky vyvinutých proužků. C+ strip nelze použít pro interpretaci výsledků stripů z blotů jiné výrobní šarže.

2. Odstříhnete požadované množství stripů (R1) skalpelem a čistým rovným průhledným pravítkem tak, aby byla modrá linie na stripech: držte stripy pevně pravítkem a odřízněte je po straně (čísla jsou viditelná přes pravítko).

3. Dejte 1,2ml pufru na vzorek (R2) do každého kanálku podle stanoveného plánu.

4. Umístěte podle stoupajících čísel stripy do kanálků: nechte stripy rehydratovat na povrchu pufru asi 1 minutu s čísly viditelnými nahoře, PAK jemně zamíchejte vaničkou, aby byly stripy dobře pokryty pufrem.

5. Dejte vzorky a pozitivní kontrolu (kontroly) podle určeného plánu v množství 25 μ l (pro CSF raději 50 μ l) na žlábek. Opatrně zamíchejte vaničkou po každé dispenciaci.

Položte vaničku na třepačku při pokojové teplotě.

- Sérum: **Inkubujte 90min \pm 5min** při 20-26°C
- CSF: **Inkubujte přes noc (16 hod \pm 2hod)** při 20-26°C. Podnos je nutné zakrýt alobalem, aby nevyschl.

6. Krok promytí: Vyprázdněte obsah žlábků Pasteurovou pipetou nebo překlopením vaničky. Dejte 2 až 3ml zředěného promývacího pufru do každého kanálku. Inkubujte na třepačce 3 min. Opakujte 2krát, pak vyprázdněte obsah žlábků. Dbejte, aby se stripy během tohoto kroku neobrátily.

7. Dispenzujte podle distribučního plánu 1.2ml konjugátu anti-IgG (R3) do příslušných jamek. **Inkubujte 60min \pm 5min** při 20-26°C.

8. Promytí: opakujte krok 6.

9. Do žlábků pipetujte 1,2 ml NBT/BCIP substrátu (R5). Položte na třepačku a chraňte před přímým světlem. **Inkubujte 60min \pm 5min** při 20-26°C.

Bez ohledu o jaký jde parametr, pravidelně kontrolujte vývoj zbarvení. Vývoj může být zastaven, pokud proužky nebudou dobře kontrastovat s pozadím stripů (kvalita promytí má zásadní vliv na zbarvení pozadí). Počítejte s tím, že stripy zesvětlí, jakmile vyschnou.

10. Zastavte reakci odsátím substrátu Pasteurovou pipetou nebo překlopením inkubační vaničky a dispenciací 2ml destilované vody na žlábek. Opakujte poslední promývací krok jednou nebo vícekrát.

11. Vysušení stripů: Když je ještě ve žlábkách voda, berte stripy pomocí pinzet na očíslované straně a pokládejte je na absorpční Whatman papír tak, aby byla čísla vidět. Nechte je uschnout. Barva po vysušení přirozeně zesvětlí. Interpretace se provádí až po úplném vysušení.

12. Uložení: Přeneste stripy na papír, na kterém je budete archivovat. Srovnajte je vedle sebe. Urovnejte je pravítkem a nahoře přilepte průsvitnou páskou.

Pro správnou interpretaci musí být stripy seřazeny podle transferu a jejich pořadového čísla, maximálně několik milimetrů od sebe. Není možné srovnávat stripy, které byly umístěny od sebe daleko (např. č. 2 a 15). **Je chybné** (kvůli falešným výsledkům) srovnávat stripy různých šarží (stripy s různými výrobními čísly).

KONTROLA KVALITY A INTERPRETACE

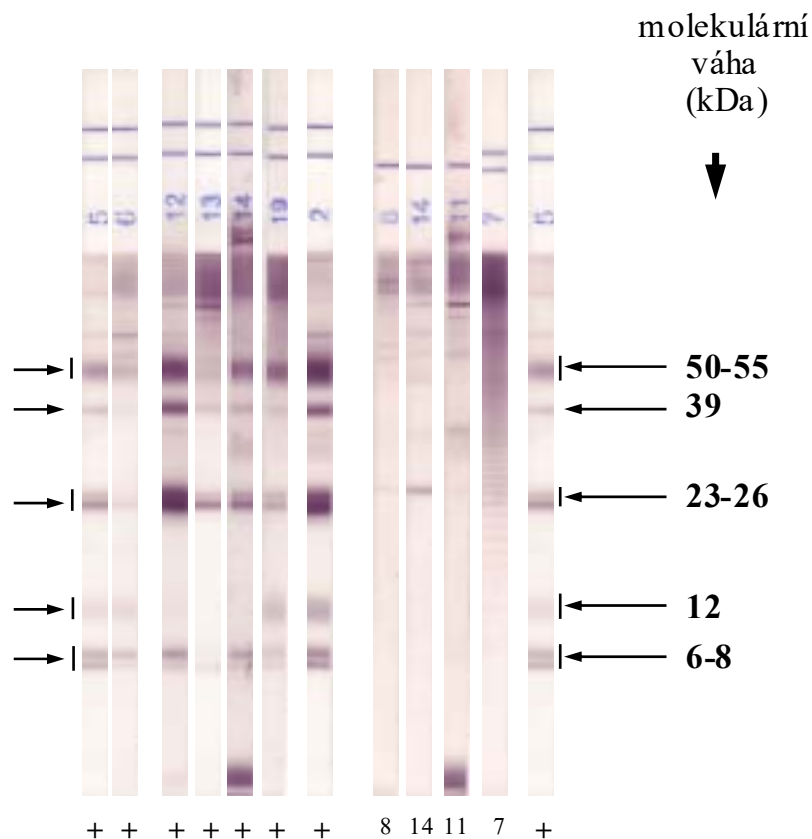
Kontrolní sérum (R10) dodané v kitu musí být systematicky zahrnuto v každé sérii imunoblotů. Vykazuje typický profil a umožňuje technickou validaci správného provedení testu (proužky musí být na stripu jasně viditelné) a přesně kalibrovat pozici a povahu specifických proužků, aby se umožnila interpretace výsledků stripů ze stejného transferu (stejně výrobní číslo).

Poznámka: Profil pozitivní kontroly (R10) se může lišit podle počtu šarží použitých reagensů. Odpovídající obrázky jsou k dispozici na našem webu www.ldbiodiagnostics.com jako příklad.

Popis proužků

Pozitivní vzorek vykazuje početné proužky lokované mezi 2 a 200 kilodaltony (kDa). V praxi a kvůli specifitě se pro odečet vybere pouze oblast od 6 do 55 kDa.

V této oblasti se nejčastěji prezentuje 5 proužků s následujícími molekulovými hmotnostmi (**kDa**): **6-8, 12, 23-26, 39, 50-55**. Tudíž se označují jako: **P6-8, P12, P23-26, P39 a P50-55**.



Obr. 1: Příklady pozitivních a negativních výsledků

Profily jsou uvedeny jako příklady. Proužky jsou označeny písmenem "E" specifickým pro parametr ze šarže "04010".

Rsy proužků

Proužky **P6-8 a P23-26** se mohou objevit ve formě velkých jednotlivých proužků nebo jako dvojitý proužek. Proužek **P50-55** se tradičně jeví samostatně ve formě širokého proužku s poměrně rozmazanými okraji.

Důležité body -Praktické poznámky (viz **Obr.1**)

Oblasti 6-26 kDa a 39-55 kDa jsou nejvíce specifické a nejjednodušeji odečitelné a interpretovatelné.

Střední oblast mezi P23-26 a P39 není zcela specifická pro cysticercózu (časté zkřížené reakce, zejména s ostatními helminthiázami a malárií *P. falciparum*).

Interpretace

Přítomnost minimálně **2 jasně definovaných proužků** z 5 výše popsaných proužků, P6-8, P12, P23-26, P39 a P50-55, je indikativní pro cysticercózu v séru a neurocysticercózu v CSF.

Příklady z obrázku výše: „+“ = neurocysticercóza - 8,14,11 = hydatidóza - 7= alveolární echinokokóza

Pozn.: Strip 7 představuje nespecifické uspořádání „Mikado“ (viz Řešení potíží)

Pro validaci výsledků vždy srovnávejte profil každého imunoblotu u každého vzorku s pozitivní kontrolou R10. Rysy proužků jsou zásadní při interpretaci testu.

OMEZENÍ POUZITÍ

- Diagnóza infekčního onemocnění nesmí být založena na základě jednotlivého výsledku testu.
- Sérologické výsledky se musí interpretovat na základě dostupných informací (např.: epidemiologických, klinických, vzhledových, biologických...), aby byla stanovena diagnóza. Neměli by se používat k stanovení diagnózy pouze na základě jejich positivity.

PROVEDENÍ (viz odkazy na literaturu)

Citlivost

Hodnocení zahrnovalo 79 vzorků (70 sér a 9 CSF), které byly pozitivní podle klinických, epidemiologických, radiologických a/nebo sérologických kritérií.

77 vzorků, včetně 9 x CSF bylo shledáno pozitivní. **Citlivost Se= 97,5%**

Specifita

Hodnocení zahrnovalo 95 vzorků, včetně 81 sér od pacientů trpících následujícími parazitickými infekcemi: *Toxocara canis* (7), *Trichinella spiralis* (14), *Toxoplasma gondii* (7), filariáza (7), *Fasciola hepatica* (4), *Echinococcus granulosus* (14), *E. multilocularis* (14), *Schistosoma* sp. (14) a 14 sér od pacientů trpících autoimunitními chorobami: RF+ revmatoidní faktor (7) a ANA+ antinukleární protilátky (7). Všechny byly shledány negativní. **Specifita Sp = 100%**

Pozn.: určité vzorky vykazovaly izolované přímé proužky, které nesmí být zaměněny se specifickými proužky (viz **Obr.1**). Charakteristický je zejména rys proužku **P50-55** (velký a difuzní), který se odlišuje od rovných proužků, které se někdy nacházejí na této úrovni v sérech s echinokokózou, hydatidózou nebo schistosomiázou.

Závěr

Korelace mezi cysticercózou WB a klinickým stavem je vynikající.

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

Specifičnost = 100% [IC95: 95,1 - 100%]

Intervaly spolehlivosti se počítají podle Wilsonovy metody s korekcí kontinuity.

Reprodukovatelnost

Byla testována reprodukovatelnost mezi šaržemi a uvnitř šarže. V obou případech excelentně odpovídaly specifické proužky mezi séry.

Interference

Přestože nebyla pozorována zkřížená reakce u hemolyzovaných, ikterických nebo lipemických sér, je doporučeno interpretovat výsledky z každého vzorku séra s opatrností.

ŘEŠENÍ POTIZI

"Proužky jsou slabé, s malým kontrastem": Určitá séra s nízkou koncentrací protilátek mohou dávat takové výsledky.

"Odstínované oblasti, více nebo méně zbarvené, lehce difúzní": Strip nebyl zcela ponořen do některé reagentie a neinkuboval se správně po celé délce. Zabarvení také může být v případě, kdy byl vzorek nanesen a nebyla vanička protřepána.

"Šum pozadí je výrazný, ztěžuje odečít": Promývání nebyla dostatečná nebo byla poslední inkubace příliš dlouhá. Zajistěte správnou techniku provedení, dodržujte doby promytí a jejich kvalitu. Zkraťte dobu poslední inkubace.

Výjimečně mohou některá séra reagovat nespecifickou vazbou. Pak nelze výsledek imunoblotu použít. Tento nespecifický šum pozadí může mít vliv pouze na část stripu, takže může být neinterpretovatelná pouze daná část.

"Během posledního kroku vyvíjení se objeví precipitát v roztoku": substrát se může částečně vysrážet (černé sraženiny) v pufru na konci vyvíjení. Tento fenomén neovlivní kvalitu vyvíjení, která musí normálně pokračovat. Poslední promytí destilovanou vodou eliminuje možné přítomné pevné částice.

LITERATURA

- Deckers, Nynke, et Pierre Dorny. 2010. « Immunodiagnosis of Taenia Solium Taeniosis/cysticercosis ». *Trends in Parasitology* 26 (3): 137-44. doi:10.1016/j.pt.2009.12.008.
- Del Brutto, Oscar H. 2012. « Diagnostic Criteria for Neurocysticercosis, Revisited ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 299-304. doi:10.1179/2047773212Y.0000000025.
- Dournon, Nathalie, Loïc Epelboin, Marie-Charlotte Brion, Luc Paris, François Bricaire, et Eric Caumes. 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, Hector H, Theodore E Nash, et Oscar H Del Brutto. 2014. « Clinical Symptoms, Diagnosis, and Treatment of Neurocysticercosis ». *The Lancet Neurology* 13 (12): 1202-15. doi:10.1016/S14744422(14)70094-8.
- Gekeler, F, S Eichenlaub, E G Mendoza, J Sotelo, M Hoelscher, et T Löscher. 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, Lorraine, Agnès Fleury, Edda Sciutto, Eric Kendjo, Gladis Fragoso, Luc Paris, et Bernard Bouteille. 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, C P, P Agnamey, J Boncy, J-H Henrys, et A Totet. 2009. « Seroprevalence of human Taenia solium cysticercosis in Haiti ». *Journal of helminthology* 83 (2): 113-16. doi:10.1017/S0022149X09232330.
- Rodriguez, Silvia, Patricia Wilkins, et Pierre Dorny. 2012. « Immunological and Molecular Diagnosis of Cysticercosis ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 286-98. doi:10.1179/2047773212Y.0000000048.
- Šoba, Barbara, Bojana Beović, Zala Lužnik, Miha Skvarč, et Jernej Logar. 2014. « Evidence of Human Neurocysticercosis in Slovenia ». *Parasitology* 141 (04): 547-53. doi:10.1017/S0031182013001947.

Van Doorn, H. Rogier, Ellen Wentink-Bonnema, Rob J. Rentenaar, et Tom van Gool. 2007. « Specific Cross-Reactivity in Sera from Cystic Echinococcosis Patients in an Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer 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.

Upozornění na aktualizaci - čtěte pozorně

Datum vydání	Verze	Shrnutí úprav
06/08/2021	Vs 19	Odstranění bezpečnostního varování R5 - Noční inkubace - Kontaktní e -mailová adresa – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs20	Nová adresa
05/04/2023	Vs21	R6 bez NaN3. Proužek označený písmenem. Možné použití činidel z různých šarží.



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