FASCIOLA ES

CE

Western Blot IgG

In vitro diagnostický test Immunoblot
Poloautomatická / manuální technika

#FAS ES-WB24G: 24 testů
#FAS ES-WB12G: 12 testů
#FAS ES-WB96G: 96 testů

INSTRUKCE NA POUŽITÍ

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

ÚČEL POUŽITÍ

FASCIOLA ES IgG Western Blot (WB) je kvalitativní test na jedno použití pro sérologickou diagnostiku IgG pomocí imunoblotu pro fasciolóza.

PRINCIP TESTU

Western Blot technika

ES (exkrečně-sekreční) antigeny *Fasciola hepatica* se po separaci elektroforézou vážou na povrch nitrocelulózové 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* (#FAS ES-WB24G)
kurzíva: pro balení *12 testů (#FAS ES-WB12G)* - **tučně:** balení **96 testů (#FAS ES-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 100µl (1*00*, **2x100**) POZITIVNÍ KONTROLNÍ SÉRUM (K přímému použití – červený uzávěr)	Pufr + sdružené lidské sérum, sérologicky pozitivní na fasciolóza + 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.**

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

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

DALŠÍ NEDODANÝ NUTNÝ MATERIÁL

- 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 10µl, 1.2 ml a 2 ml).
- Destilovaná nebo deionizovaná voda. Absorbční papír (např. filtrační papír Whatman), průhledná lepící páska.
- Rukavice, pinzety na uchopení stripů, řezátko nebo skalpel, rovné průhledné pravítko.

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

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte mezi 2 a 8°C. Reagencie 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.

UPOZORNĚNÍ PRO POUŽITÍ

Bezpečnost

- Pouze pro *in vitro* použití. Pouze pro profesionální použití. Pouze pro technicky vyškolený personál. Pracujte podle zásad správné laboratorní praxe a považujte každou reagencii 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.
- Reagencie 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 reagencie...) podle zásad správné laboratorní praxe, platných v současnosti ve vaší zemi.
- Jakýkoli závažný incident musí být předmětem ohlášení výrobci 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 započetím testu.
- Nedotýkejte se stripů prsty; použijte pinzety.
- Reagencie musí být před použitím dobře promíchány, zejména koncentrovaný promývací pufr.
- Po použití uzavřete lahvičky; nepoužívejte je, pokud se reagencie znečistí. Nepoužívejte reagencie z lahvičky, která teče. Nepoužívejte zakalené nebo vysrážené roztoky.
- Používejte pouze jednorázové pipetovací špičky. Vyvarujte se kontaminace mezi žlábky. Sledujte tvorbu pěny nebo bublin v pipetovací špičce (bakteriální kontaminace lahvičky s reagencií).
- 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.

ODBĚR VZORKU

Vzorky séra odebírejte asepticky do suchých zkumavek. Pro testování je požadováno minimum 10 µl séra.

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.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Promývací roztok: Na 4 testy nařeďte 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. Odstřihněte 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 2 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 10µl) na žlábek. Opatrně zamíchejte vaničkou po každé dispenzaci. Položte vaničku na třepačku při pokojové teplotě. **Inkubujte 90min ±5min** při 20-26°C

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** ±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** ±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 dispenzací 2ml destilované vody na žlábek. Opakujte poslední promývací krok jednou nebo vícekrát.

11. Vysušení stripů: Když je ještě ve žlábcích voda, berte stripy pomocí pinzet na očíslované straně a pokládejte je na absorbční 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. Srovnejte 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

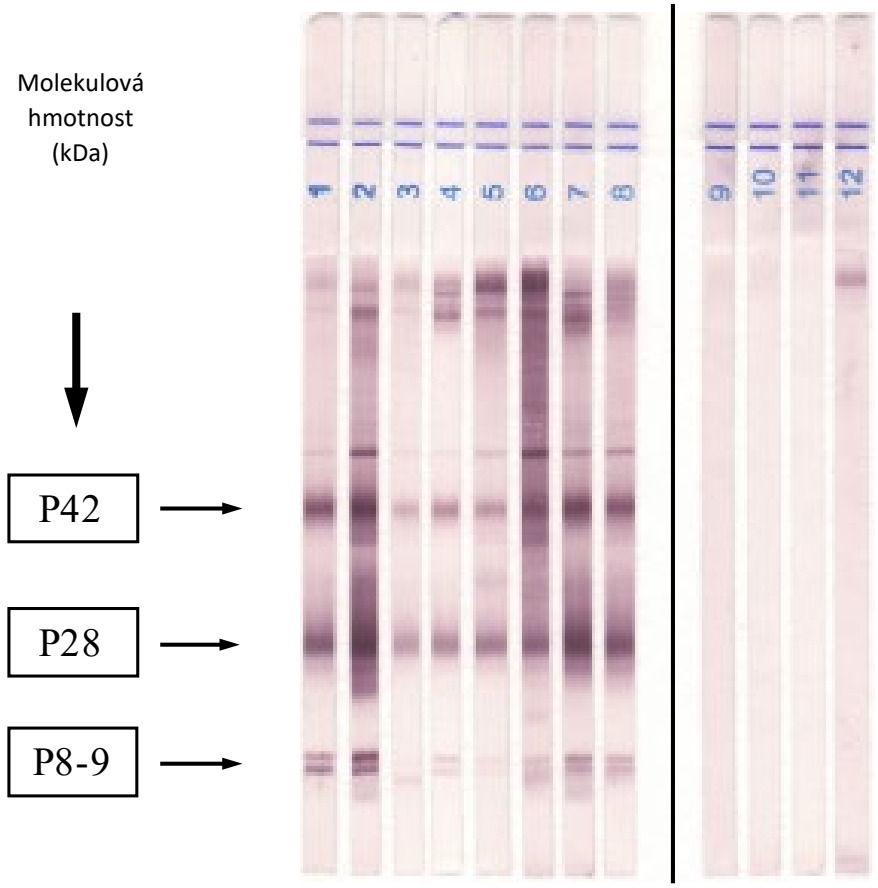
Kontrolní sérum (R10) dodané v kitu musí být systematicky zahrnuto v každé sérii imunoblotů. Vykazuje typický profil a umožňuje technickou validaci správného provedení testu (proužky musí být na stripu jasně viditelné) a přesně kalibrovat pozici a povahu specifických proužků, aby se umožnila interpretace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

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

Popis proužků

Pozitivní vzorek může obsahovat množství proužků, umístěných mezi 120 a 7 kDa.

Mezi více nebo méně vyznačenými proužky, které lze najít v této oblasti, byly speciálně 3 z nich vybrány pro jejich specificitu, senzitivitu a jejich jednoduchý odečet**:** pár na 8-9 kDa, velký proužek na 28 kDa (často spojený s úzkým proužkem na 25 kDa) a velký proužek na 42 kDa. Označují se tedy: **P8-9, P28 a P42.**



Obr. 1: *Příklady pozitivních a negativních výsledků*

Profily jsou uvedeny jako příklady. Proužky jsou označeny písmenem "H" specifickým pro parametr ze šarže "07012".

Interpretace

Simultánní přítomnost dvou proužků z **P8-9, P28 a P42** a zařazení **P28** je indikací fasciolózy.

"POZITIVNÍ" stripy výše ukazují různé příklady nalezených specifických profilů.

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

OMEZENÍ POUŽITÍ

- 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 pozitivity.

PROVEDENÍ (viz odkazy na literaturu)

Proběhlo hodnocení provedení kitu **FASCIOLA ES WB IgG** (*Fasciola hepatica* - ***ES*** **antigen**) a bylo srovnáno s předchozí verzí LDBIO Diagnostics kit FASCIOLA WB IgG CE (*Fasciola hepatica* - **Total Antigen**), uváděné dále jako: REFERENCE WB, prodávané od roku 2004.

Senzitivita (Se)

Studované vzorky odpovídaly 75 sérům od pacientů s podezřením na klinickou fasciolózu. Těchto 75 sér bylo testováno paralelně s **FASCIOLA ES WB IgG** a s REFERENCE WB.

n=75	REFERENCE WB	FAS ES WB IgG
POZITIVNÍ	**75**	**75**
NEGATIVNÍ	0	0

Tabulka 1: *Korelace FASCIOLA ES WB IgG / WB REFERENCE*

Shoda byla vynikající ***(Se=100%)***

n = 75

Charakter specifických proužků (kDa)	P8-9	P28	P42
Frekvence %	65.3	100.0	100.0

Tabulka 2: Frekvence přítomnosti každého ze specifických proužků, pozorovaných na imunoblotech během naší studie na 75 pozitivních vzorcích.

Specificita (Sp)

151 sér s parazitickými a fungálními infekcemi, autoimunitními chorobami a od krevních dárců, bylo testováno s **FASCIOLA ES WB IgG**: *Echinococcus multilocularis* (7), *E.granulosus* (7*), Taenia solium* (cysticerkóza) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malárie (7), *Candida* spp (7), RF+ revmatoidní faktor (7), ANA+ antinukleární protilátky (7), krevní dárci (53).

Specificita proužků P8-9, P28 a P42 od ES antigenu je 100%. Proužky mimo toto rozmezí nejsou považovány za specifické.

Závěr

Shoda mezi oběma technikami je perfektní a specificita kitu je vynikající.

Ve srovnání s referenčním WB měl kit **Fasciola ES WB IgG WB:**

Se = 100% [IC95 93,9 - 100%]
Sp = 100% [IC95 96,9 - 100%]

Intervaly spolehlivosti byly vypočteny 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 POTÍŽÍ

*"**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 reagencie 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 odečet**":* 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

Agnamey P, Fortes-Lopes E, Raccurt CP, Boncy J, et Totet A. 2012. « Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in haiti ». *Journal of parasitology research* 2012: 751951. doi:10.1155/2012/751951.

Arafa MS, Abaza SM, El-Shewy KA, Mohareb EW, et El-Moamly AA. 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 PJ, Savioli L, et Fenwick A. 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 MK, Sajid MS, Riaz H, Ahmad NE, He L, Shahzad M, Hussain A, Khan MN, Iqbal Z, et Zhao J. 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 R, Agramunt VH, Cuervo P, et Mas-Coma S. 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, Dreyfuss G, Bouteille B, et Dardé ML. 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 MR, McGarry JW, Felstead S, Ortiz P, Akca A, et Williams DJL. 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 AI, et Uga S. 2014. « Review of Parasitic Zoonoses in Egypt ». *Tropical Medicine and Health* 42 (1): 3-14. doi:10.2149/tmh.2013-23.

Upozornění na aktualizaci - čtěte pozorně

Datum vydání	Verze	Shrnutí úprav
11/08/2021	Vs 17	Odstranění bezpečnostního varování R5 - Noční inkubace - Kontaktní e -mailová adresa – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs18	Nová adresa
	Vs19	R6 bez NaN3. Proužek označený písmenem. Možné použití činidel z různých šarží.

LDBIO Diagnostics

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