

TRICHINELLA ES



Western Blot IgG

In vitro diagnostický test Immunoblot
Poloautomatická / manuální technika

#TRI ES-WB24G: 24 testů

#TRI ES-WB12G: 12 testů

#TRI ES-WB96G: 96 testů

INSTRUKCE NA POUŽITÍ

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

ÚCEL POUZITÍ

TRICHINELLA ES Western Blot (WB) IgG je kvalitativní test na jedno použití pro sérologickou diagnostiku IgG pomocí stanovení immunoblot pro trichinelózu. Je určený pro konfirmační testování pozitivního nebo hraničního výsledku, získaného při klasickém screeningovém testu.

PRINCIP TESTU

Western Blot technika

Antigeny ES (Excreted/Secreted) *Trichinella spiralis* se po separaci elektroforézou vážou elektroblotováním na povrch nitrocelulózové membrány (tzv. transfer). Ta se rozstříhá na 24 stripů označených od 1 do 24.

Provedení testu

Každý vzorek séra se testuje odděleně inkubací se stripem. Protilátky proti *trichinelózu*, potenciálně přítomné ve vzorku, se selektivně vážou na antigeny *T. spiralis*. Konjugát alkalické fosfatázy a protilidského IgG se pak váže na navázané protilátky proti *trichinelózu*. Nakonec imunokomplexy reagují se substrátem. Antigeny rozlišené protilátkami proti *trichinelózu* typu IgG, přítomné ve vzorku, se projeví jako purpurové příčné proužky.

Reagencie dodané

Výchozí: balíček 24 testů (#TRI ES-WB24G)

kurzívou: balení 12 testů (#TRI ES-WB12G) - **tučně**: balení 96 testů (#TRI ES-WB96G).

ID	Ks	Popis	Složení
R1	1	Obal(y) obsahující 24 (12, 4x24) STRIPŮ: nastříhané + zbarvené Standardy. (Každá záložka a každý transfer je identifikovaný unikátním sériovým 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 s 30 (30, 125) ml pufru na ředění vzorku SAMPLE BUFFER (k přímému použití - růžový roztok).	Pufr + surfaktant.
R3	1	Lahvička (y) s 30 (30, 2x60) ml konjugátu ANTI IgG CONJUGATE (k přímému použití – modrý roztok).	Pufr + protilidské IgG polyklonální kozí sérum konjugované s alkalickou fosfatázou + NaN3 (<0.1%) + stabilizátory.
R5	1	Lahvička s 30 (30, 125) ml substrátu - SUBSTRATE (k přímému použití – tmavá hnědá lahvička).	Pufr + NBT + BCIP + stabilizátory.
R6	1	Lahvička obsahující 60 (60, 250) ml koncentrovaného promývacího roztoku - WASH CONCENTRATE 10X BUFFER (Musí se 10x zředit s destilovanou vodou – bezbarvý roztok).	Pufr + surfactant.
R10	1	Zkumavka s 200 (200, 2x200) µl - POZITIVNÍ KONTROLNÍ SÉRUM (k přímému použití – červené víčko).	Pufr + pool lidského séra sérologicky pozitivního na <i>Trichinella</i> + NaN3 (<0.1%) + stabilizátory.

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

R2, R3, R5 a R6 jsou obecné pro všechny kity a mají unikátní číslo šarže podle svého data výroby. **Je doporučeno provádět multiparametrové testování (viz škála imunoblotů LDBIO), aby se omezil počet otevření lahvíček a usnadnilo se řízení kvality.**

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.

DALŠÍ NUTNÝ ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL

- Multikanálové polypropylénové inkubační vaničky pro miniblotty (# WBPP- 08 nebo obdobné).
- Třepačka pro imunoblotty, 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 lepící 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 lahvíček.

UCHOVÁVÁNÍ A STABILITA

Uchovávejte mezi 2 a 8°C. Reagentie z kitu jsou stabilní do data expirace uvedeného na vnějším obalu a na štítcích lahvíček. 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.
- 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 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. Nemíchejte stripy různých sériových čísel, řiďte se podle posloupností transferů. Zaveďte si specifický distribuční plán před započítáním 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 žlábkami. Sledujte tvorbu pěny nebo bublin v pipetovací špičce (bakteriální kontaminace lahvičky s reagensii).
- 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

Asepticky odebírejte vzorky do suché zkumavky. Je požadováno minimálně 25 µL séra.

Uchovejte vzorky při 2-8 °C až do jejich testování. Při skladování delším než jeden týden, zmrazte vzorek na -20 ± 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 reagensii

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

Postup testu

Poznámka: Je doporučeno provést multiparametrové testování (viz škála imunoblotů 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 použití tohoto kontroly umožňuje technicky ověřit manipulaci a pro dané sériové číslo identifikovat odhalená specifická pásma. Strip C+ nelze použít na interpretaci výsledků stripů z blotu odlišného sériového čísla.

2. Odřízněte požadovaný počet stripů (R1) pomocí skalpelu a čistého, suchého průhledného pravítka, aby zůstala modrá linie na stripech: držte stripy pevně pravítkem a po straně je odřízněte (čísla jsou viditelná přes pravítko).
3. Dejte 1.2 ml pufru na vzorek (R2) do každého žlábků podle vypracovaného plánu.
4. Umístěte podle čísel očíslované stripy do žlábků. Nechte stripy rehydratovat asi 2min, číslo musí být viditelné nahoře, s opatrným třepáním vaničkou, aby se zcela ponořily do pufru.
5. Dejte vzorky a pozitivní kontrolu(kontroly) podle distribučního plánu vždy 25 µl na žlábek. Opatrně zamíchejte vaničkou po každé dispenciaci. Položte vaničku na třepačku.
Inkubujte 90 min ± 5 min při 20-26 °C.
6. Promývací krok: Vyprázdněte obsah žlábků Pasteurovou pipetou nebo překlopením inkubační vaničky. Dejte 2 až 3 ml naředěného promývacího pufru do každého žlábků. Inkubujte na třepačce 3 min. Opakujte 2krát, pak vyprázdněte obsah žlábků. Dbejte, aby se stripy během tohoto kroku neobrátily.
7. Dejte 1.2 ml konjugátu anti IgG (R3) do každého žlábků. Umístěte na třepačku.
Inkubujte 60 min ± 5 min při 20-26 °C.
8. Promývací krok: opakujte krok 6.
9. Dejte 1.2 ml NBT/BCIP substrátu (R5) do každého žlábků. Umístěte na třepačku a chraňte před přímým světlem.
Inkubujte 60 min ± 5 min při 20-26 °C.

Bez ohledu, o jaký parametr jde, pravidelně kontrolujte vývoj zabarvení. Vývoj může být zastaven, pokud by barva pozadí ztěžovala odečet stripů (kvalita promývacích kroků má zásadní vliv na vybarvení pozadí). Pamatujte, že stripy po vyschnutí zesvětlí.

10. Zastavte reakci odsátím substrátu Pasteurovou pipetou nebo převrácením inkubační vaničky a přidáním 2 ml destilované vody do kanálků. Tento poslední promývací krok opakujte ještě jednou.
11. Vysušení stripů: Když je ještě ve žlábkách voda, berte stripy pomocí pinzet na očíslované straně a pokládejte je na absorbční papír Whatman tak, aby bylo vidět čísla. Nechte je oschnout. Barva se po vysušení zesvětlí. Interpretace se musí provést až po úplném vysušení.
12. Uchovávání: Přeneste stripy na papír, na kterém je budete archivovat. Vyrovnajte je podle linie. Přidržte je na místě rovným pravítkem a na horním konci je přilepte průhlednou páskou.

Pro správnou interpretaci musí být stripy seřazeny podle transferu a podle jejich čísel, maximálně několik milimetrů od sebe. Není možné srovnávat stripy, které jsou umístěny daleko od sebe (např. č.2 s č. 15). **Je chybné** (falešný výsledek) srovnávat stripy z různých kitů (stripy s odlišným sériovým číslem).

Kontrola kvality a interpretace

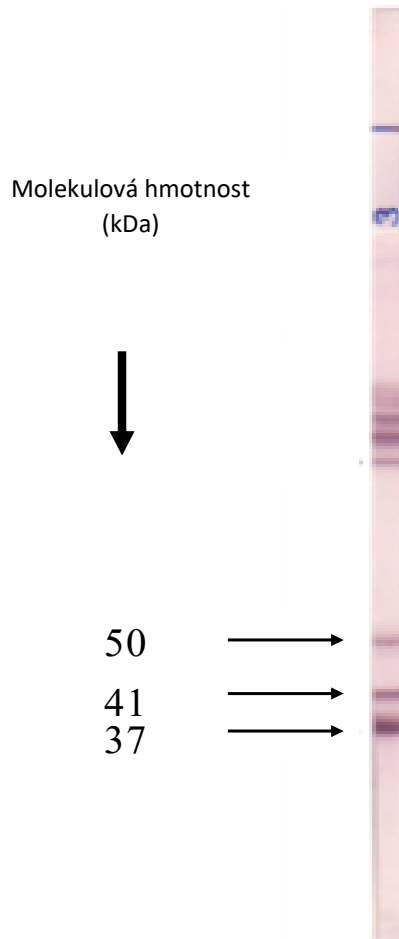
Dodané kontrolní sérum (R10) v kitu musí být systematicky zahrnováno v každé sérii imunoblotů. Vykazuje typický profil a umožňuje technickou validaci správného provedení testu (proužky se musí objevit na stripu velmi jasně) a také přesně kalibruje pozice a aspekty specifických proužků a umožňuje interpretaci výsledků stripů ze stejného transferu (stejně sériové 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 výsledek představují proužky přítomné mezi 37 a 140 kDa. V praxi a kvůli jednoduchosti se pro odečet vybere pouze oblast s nízkými molekulovými hmotnostmi (37 a 50 kDa).

3 proužky jsou systematicky přítomné na 37, 41 a 50 kDa. Nazývají se tedy : **P37, P41 a P50**. Proužky P37 a P41 jsou intenzivnější. Proužek P50 je velmi často slabší.



Obr. 1 : Příklady pozitivních výsledků

Profily jsou uvedeny jako příklady. Proužky jsou označeny písmenem "F" specifickým pro parametr ze šarže "05011".

Interpretace:

Současná přítomnost 3 proužků **P37, P41 a P50** je indikací trichinelózy.

Pro validaci výsledků vždy srovnávejte profil imunoblotu každého vzorku s R10 pozitivní kontrolou. Aspekt proužků je důležitý pro interpretaci testu.

Omezení použití

- Diagnózu infekčního onemocnění nelze stanovit na základě jediného výsledku testu.
- Pro stanovení diagnózy je nutné interpretovat sérologické výsledky podle dostupných informací (např. Epidemiologie, klinické, zobrazovací, biologické ...). Neměli by se používat k stanovení diagnózy pouze na základě jejich positivity.

Provedení (viz odkazy na literaturu)

Hodnocení provedení kitu **TRICHINELLA ES WB IgG** (*T. spiralis* ES antigen) bylo zpracováno v nezávislé laboratoři srovnáním s předchozí verzí kitu LDBIO Diagnostics (TRICHINELLA WB IgG - **total antigen**), reference níže: Rerence WB, prodáváný od roku 2001.

Citlivost (Se)

Studované vzorky odpovídaly 80 sérům od pacientů trpících klinickou trichinelózou.

Senzitivita reference WB = 98.8%

Senzitivita **Trichinella ES WB IgG** = **97.5%**

Specificita (Sp)

Bylo testováno 165 sér od pacientů s helmintiázou na přítomnost zkřížené reakce: Toxocara (34), Schistosoma (34), filaria (5), echinokokóza (17) fasciolóza (2), strongyloidóza (5), cysticerkóza (27) a také další autoimunitní patologie: revmatoidní faktor (9), autoprotilátky (32).

Specificita reference WB = 95.7%

Specificita **TRICHINELLA ES WB IgG** = **96.4%**

Poznámka: Systematická studie 500 vzorků krevních dárců zjistila 2.4% promořenost pozitivní sérologie s kitem TRICHINELLA ES WB IgG. U reference WB je to 6.4%. Tyto výsledky, které často mají slabou intenzitu, ale jsou přesto překvapující, byly publikovány v roce 2011 během 13. ICT (International Congress on Trichinellosis). Vysvětleno to zatím nebylo.

Závěr

Korelace mezi WB TRICHINELLA ES IgG a klinickým stavem je vynikající.

Citlivost Se = 97.5% [CI95 91.2 – 98.5%]

Specifičnost Sp = 96.4% [CI95 90.4 – 99.6%]

Intervaly spolehlivosti jsou vypočteny podle Wilsonovy metody s korekcí kontinuity.

Reprodukovatelnost:

Byla testována reprodukovatelnost mezi sériemi a mezi šaržemi. V obou případech je shoda mezi séry s ohledem na specifické proužky excelentní.

Interference:

Přestože nebyla pozorována zkřížená reakce u hemolyzovaných, ikterických nebo lipemických sér, je doporučeno vždy interpretovat výsledky takových vzorků 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 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 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.

Bibliografie

- H. Barennes, S. Sayasone, P. Odermatt, A. De Bruyne, S. Hongsakhone, P. N. Newton, P. Vongphrachanh, B. Martinez-Aussel, M. Strobel, et J. Dupouy-Camet, « A major *trichinellosis* outbreak suggesting a high endemicity of *Trichinella* infection in northern Laos », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 78, n° 1, p. 40-44, janv. 2008.
- P. Dorny, N. Praet, N. Deckers, et S. Gabriel, « Emerging food-borne parasites », *Vet. Parasitol.*, vol. 163, n° 3, p. 196-206, août 2009.
- J. Dupouy-Camet, H. Talabani, et T. Ancelle, « *Trichinellosis* », *Rev Prat*, vol. 60, n° 2, p. 159-164, févr. 2010.
- J. Dupouy-Camet, « *Trichinellosis*: still a concern for Europe », *Euro Surveill.*, vol. 11, n° 1, p. 5, 2006.
- B. Gottstein, E. Pozio, et K. Nockler, « Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of *Trichinellosis* », *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, n° 1, p. 127-145, janv. 2009.
- K. Nöckler, S. Reckinger, A. Broglia, A. Mayer-Scholl, et P. Bahn, « Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera », *Vet. Parasitol.*, vol. 163, n° 4, p. 341-347, août 2009.
- E. Pozio et D. S. Zarlenga, « New pieces of the *Trichinella* puzzle », *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, n° 12-13, p. 983-997, nov. 2013.
- E. Pozio, « World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans », *Vet. Parasitol.*, vol. 149, n° 1-2, p. 3-21, oct. 2007.
- E. Pozio, « The opportunistic nature of *Trichinella*-exploitation of new geographies and habitats », *Vet. Parasitol.*, vol. 194, n° 2-4, p. 128-132, mai 2013.
- H. Yera, S. Andiva, C. Perret, D. Limonne, P. Boireau, et J. Dupouy-Camet, « Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human *trichinellosis* », *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 10, n° 5, p. 793-796, sept. 2003.
- Yera H., Mergely T., Limonne D., Lureau P. Dupouy-Camet J., « Seroprevalence of *Trichinella* antibodies in blood donors in France. », představil 13th ICT (Int. Conf. on Trichinellosis), Changchun, China, 2011.

Upozornění na aktualizaci - čtěte pozorně

Datum vydání	Verze	Shrnutí úprav
12/08/2021	Vs 15	Odstranění bezpečnostního varování R5 - kontaktní e-mailová adresa – NaN3 EUH032.
30/11/2022	Vs16	Nová adresa
16/01/2023	Vs17	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