

TRICHINELLA ES

CE



Western Blot IgG

Test *in vitro* Test imunoblot
Tehnica semi-automată / manuală

#TRI ES-WB24G : 24 teste

#TRI ES-WB12G : 12 teste

#TRI ES-WB96G : 96 teste

INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Găsiți mai multe informații și instrucțiuni de utilizare în limba dvs. pe site-ul nostru
www.ldbiodiagnostics.com

UTILIZARE PREVAZUTA

TRICHINELLA ES Western Blot (WB) IgG este un test calitativ de o singură utilizare de diagnosticare serologică IgG printr-un Test Immunoblot de trichineloză utilizat pentru confirmarea testării în cazul unui rezultat pozitiv sau echivoc obținut prin intermediul testelor clasice de screening.

PRINCIPIUL TESTULUI

Metoda Western Blot

Antigenii Excretați/Secretați (ES) de *Trichinella spiralis*, odată separați prin electroforeză, se leagă prin electroblotting la suprafața unei membrane de nitroceluloză (numită transfer) tăiată în 24 de benzi numerotate de la 1 la 24.

Efectuarea testului

Fiecare specimen care urmează să fie testat este incubat separat cu o bandă. Anticorpii specifici care pot fi prezenți în probă se leagă selectiv de antigeni. Conjugatul IgG alcalin uman anti-fosfatază se leagă apoi la anticorpii legați. În cele din urmă, imunocomplexurile reacționează cu substratul. Antigenii recunoscuți de anticorpii specifici de tip IgG prezenți în probe sunt evidențiați ca benzi transversale purpurii.

REACTIVII FURNIZATI

Implicit: pachet de 24 de teste (#TRI ES-WB24G)

italic: pachet de 12 teste (#TRI ES-WB12G) - **bold**: pachet de 96 teste (#TRI ES-WB96G).

ID	Cantitate	Descriere	Compoziție
R1	1	Dosar(e) de 24 (12, 4x24) BENZI: Standarde pre-seționate + colorate. (Fiecare dosar și fiecare transfer se identifica printr-un număr de serie unic)	Nitroceluloza sensibilizată. Greutate moleculară colorată (kDa): Albastru: 250, albastru: 150, albastru: 100, roz: 75, albastru: 50, verde: 37, roz: 25, albastru: 20, albastru: 15, galben: 10.
R2	1	Flacoane de 30 (30, 125) ml de SOLUȚIE-TAMPON PENTRU PROBE (Gata de utilizare - soluție roz).	Soluție-tampon + surfactant.
R3	1	Flacoane de 30 (30, 2x60) ml de CONJUGAT ANTI IgG (Gata de utilizare – soluție albastră).	Soluție-tampon + seruri de caprine policlonale IgG anti-umane conjugate cu fosfatază alcalină + Na ₃ (<0,1%) + stabilizatori.
R5	1	Flacoane de 30 (30, 125) ml de SUBSTRAT (Gata de utilizare – flacon maro opac).	Soluție-tampon + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Flacoane de 60 (60, 250) ml de SOLUȚIE-TAMPON CONCENTRATĂ DE SPĂLARE 10X (Se diluează de 10 ori în apă distilată - soluție incoloră).	Soluție-tampon + surfactant.
R10	1	Tub de 200 (200, 2x200) μl de MARTOR SERIC POZITIV (Gata de utilizare - capac roșu).	Soluție-tampon + baie de ser pozitiv uman în serologie <i>Trichinella</i> + Na ₃ (<0.1%) + stabilizatori.

R1: Litera de dinaintea fiecărui număr de bandă este specifică parametrului.

R2, R3, R5 și R6 sunt comune tuturor kiturilor și au un număr de lot unic, în funcție de data producerii lor. **Se recomandă efectuarea testelor multi-parametru (a se vedea gama imunoblot LDBIO) pentru a limita numărul de flacoane deschise și pentru a asigura un control mai bun al calității.**

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic.

EUH 210 Fișa cu date de securitate disponibilă la cerere, precum și pe site-ul nostru web www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL SUPLIMENTAR NECESAR, DAR NEFURNIZAT

- Tăvi de incubație din polipropilenă cu canale multiple pentru mini-bloturi (# WBPP-08 sau echivalent).
- Agitator oscilant pentru imunoblot, sistem de vid pentru lichide (tuburile # WBPP-08 pe care le furnizăm pot fi golite prin simpla rotire a acestora).
- Tuburi și materiale pentru scoaterea probelor, cilindri gradați, recipiente adaptate. Pipete automate, micropipete și vârfuri de unică folosință (volum de 25 μ l, 1,2 ml și 2 ml).
- Apă distilată sau deionizată. Hârtie absorbantă (de exemplu, hârtie de filtru Whatman), bandă adezivă transparentă.
- Mănuși, pensete pentru a manipula benzile, cutter sau bisturiu, riglă transparentă.

Notă: reactivii noștri pot fi utilizați într-un procesor de imunoblot automatizat. **Trebuie să aveți grijă cu eventualele contaminări chimice ale reactivilor noștri, dacă procesorul este împărțit cu reactivi de la un alt producător** (exemplu cunoscut: contaminarea cu TWEEN 20) și contaminări bacteriene. Rezervați flaconul pentru procesor. După procesare, nu puneți reactivii rămași înapoi în flacoanele originale.

DEPOZITARE SI STABILITATE

A se păstra între 2 și 8°C. Reactivii din kit sunt stabili până la data de expirare indicată pe cutia exterioră și etichetele flaconului. Nu utilizați reactiv contaminat sau tulbure. Soluția-tampon de spălare diluat la 1/10 este stabilă timp de 2 luni la +2 până la + 8 °C și o săptămână la temperatura camerei.

PRECAUTIUNI DE UTILIZARE

Siguranță

- Numai pentru utilizare *in vitro*. Numai pentru uz profesional. Numai pentru personalul instruit tehnic. Manipulați în conformitate cu Bunele Practici de Laborator și considerați orice reactiv și orice probă ca având potențial toxic și/ sau infecțios.
- Purtați un halat de laborator, mănuși și ochelari; nu beți, nu mâncați sau nu fumați în laborator. Nu atingeți cu gura pipetele.
- Controlul pozitiv este un ser de origine umană care a fost inactivat pentru virusurile HIV 1 și 2, hepatita B și hepatita C. Cu toate acestea, trebuie tratat ca un produs cu potențial infecțios.
- Substratul conține un amestec de NBT și BCIP, toxic la contact (piele și mucoase) și inhalare.
- Reactivii conțin azidă de sodiu, care poate forma săruri metalice explozive cu plumb și cupru. Clătiți cu apă orice scurgere.
- Evacuați deșeurile (probe, vârfuri, tuburi, lichid de spălare, reactiv utilizat ...) în conformitate cu bunele practici utilizate în domeniu și reglementările actuale din țară.
- Orice incident grav trebuie să facă obiectul unei declarații către producător și autoritatea competentă.

Măsuri de precauție

- Citiți și interpretați rezultatele sub lumină albă directă.
- Este preferabil să se utilizeze toți reactivii din același lot. În cazul în care se utilizează loturi diferite, asigurați trasabilitatea.
- Utilizați benzile în ordine numerică. Nu amestecați benzi din numere de serie diferite; utilizați transferurile succesiv. Stabiliți un plan de distribuție specific înainte de a începe testul.
- Nu atingeți benzile cu degetele; utilizați pensete.
- Reactivii trebuie amestecați bine înainte de utilizare, în special soluția-tampon de spălare concentrată.
- Închideți flacoanele după utilizare; nu utilizați dacă o substanță a fost introdusă accidental în reactivi. Nu utilizați reactivul dintr-un flacon care prezintă semne de scurgere. Nu utilizați soluție turbidă sau precipitată.
- Utilizați doar vârfuri de pipetă de unică folosință. Evitați orice contaminare intra-canal. Urmăriți formarea de spumă sau bule în vârfurile pipetelor (contaminarea bacteriană a flacoanelor cu reactiv).
- Curățați tăvile de incubație numai cu apă distilată (nu folosiți niciodată detergent sau înălbitor).
- Omiterea unei probe sau distribuirea unui volum necorespunzător poate face ca rezultatul testului să fie negativ sau pozitiv, indiferent de starea reală a acestuia.

COLECTAREA SPECIMENELOR

Se colectează aseptice probele în tuburi uscate. Este necesar un minim de 25 μl de ser.

Păstrați probele la 2-8 °C până când acestea sunt prelucrate. Dacă este necesar să le depozitați mai mult de o săptămână, congelați probele la -20 ± 5°C. Nu utilizați probe contaminate. Evitați înghețarea și dezghețarea probelor în mod repetat.

Chiar dacă nu s-a observat o reacție încrucișată specială cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor obținute din utilizarea acestor probe.

PREPARAREA REACTIVILOR

Soluție-tampon de spălare: Pentru 4 teste, într-o sticlă curată, se diluează 10 ml de concentrat de spălare 10X (R6) în 90 ml de apă distilată sau deionizată. Aveți grijă să amestecați bine Soluție-tampon diluat.

PROCEDURA DE TESTARE

Nota Bene: Se recomandă efectuarea testelor multiparametrice (vezi gama de imunoblot LDBIO) pentru a limita numărul de flacoane deschise și pentru a asigura un control mai bun al calității.

1. Pregătiți un plan de distribuție pentru probe și martor pozitiv C + (R10).

Numai prin utilizarea acestui martor, testul poate fi validat din punct de vedere tehnic și făcută identificarea, pentru un anumit număr de serie, a benzilor specifice dezvoltate. O bandă C + nu poate fi utilizată pentru interpretarea rezultatelor benzilor dintr-un blot cu un număr de serie diferit.

2. Tăiați numărul necesar de benzi (R1) folosind un bisturiu și o riglă transparentă, curată și uscată, păstrând linia albastră de poziționare pe benzi: țineți benzile ferm în poziție cu rigla și le tăiați pe partea tulpinii (numerele sunt vizibile prin riglă).
3. Distribuți 1,2 ml de soluție-tampon pentru probe (R2) în fiecare canal, în conformitate cu planul stabilit.
4. Depuneți, în ordinea lor numerică, benzile numerotate în canale: Lăsați benzile să se rehidrateze la suprafață timp de aproximativ 2 minute, cu numărul vizibil în partea de sus, APOI scuturați ușor tava pentru a le scufunda complet în soluție-tampon.
5. Distribuți probele și martorul pozitiv: în conformitate cu planul de distribuție, la o rată de 25 µl pe canal. Scuturați ușor tava după fiecare eliberare. Așezați tava pe un agitator oscilant.
Se incubează timp de 90 min ± 5 minute la 20-26 ° C.
6. Pasul de spălare: Goliți conținutul canalelor cu o pipetă Pasteur sau întorcând tava de incubație. Se distribuie 2 până la 3 ml de soluție-tampon de spălare diluată în fiecare canal. Incubați pe agitatorul oscilant timp de 3 minute. Repetați de 2 ori, apoi goliți conținutul canalelor. Asigurați-vă că benzile nu se rotesc în timpul acestor pași.
7. Distribuți 1,2 ml de conjugat anti-IgG (R3) în fiecare canal. Așezați tava pe agitatorul oscilant.
Se incubează timp de 60 min ± 5 minute la 20-26 ° C.
8. Pasul de spălare: repetați etapa 6.
9. Distribuți 1,2 ml de substrat NBT / BCIP (R5) în fiecare dintre canale. Așezați-l pe agitatorul oscilant și protejați-l de lumina directă.
Se incubează timp de 60 min ± 5 minute la 20-26 ° C.

Indiferent de parametru, monitorizați dezvoltarea culorii. Dezvoltarea poate fi oprită dacă culoarea de fundal a benzii se întunecă până la punctul în care citirea este dificilă (calitatea pașilor de spălare are o influență fundamentală asupra colorării fundalului). Rețineți că benzile se vor decolora pe măsură ce se usucă.

10. Opriți reacția prin aspirarea substratului cu o pipetă Pasteur sau prin rotirea tubului de incubație și distribuirea a 2 ml de apă distilată în canale. Repetați ultima etapă de spălare încă o dată.
11. Uscarea benzilor: Cu canalele încă pline cu apă, apucați benzile de capătul numerotat folosind pensetele și așezați-le, cu numărul vizibil, pe o hârtie absorbantă Whatman. Lăsați-le să se usuce la aer. Culoarea benzilor se va deschide în mod natural în timpul uscării. Interpretarea trebuie efectuată numai după finalizarea procesului de uscare.
12. Depozitare: transferați benzile pe o foaie de hârtie, care va fi utilizată pentru a le arhiva. Aliniați liniile de poziționare. Păstrați-le în poziție cu rigla plată, lipiți partea superioară a benzilor cu bandă adezivă transparentă.

Pentru o bună interpretare, benzile trebuie ordonate prin transfer și în ordinea lor numerică, separate la o distanță de cel puțin câțiva milimetri. Nu este fiabilă compararea benzilor care au o distanță foarte mare între ele (de exemplu, nr.2 cu nr.15). **Este periculos** (rezultate false) să comparați benzile din kituri diferite (benzi cu numere de serie diferite).

CONTROTUL CALITATII SI INTERPRETAREA

Martorul seric (R10) furnizat împreună cu kitul trebuie inclus în mod sistematic în orice serie de imunoblot. Acesta prezintă profilul tipic și permite validarea tehnică a bunei desfășurări a testului (fâșiile trebuie să apară foarte clar pe bandă) și calibrarea precisă a poziției și aspectului benzilor specifice pentru a permite interpretarea rezultatelor benzilor de la același transfer (același număr de serie).

Nota Bene: Profilul de control pozitiv (R10) poate varia în funcție de numărul lotului de reactivi utilizați. Imaginile corespunzătoare sunt disponibile pe site-ul nostru www.ldbiodiagnostics.com ca exemplu.

Descrierea benzilor

Un eșantion pozitiv prezintă linii localizate între 37 și 140 kDa. În practică și pentru motive de simplificare, doar zona cu masă moleculară mică (37 și 50 kDa) este selecționată pentru citire.

3 linii sunt prezente în mod sistematic la 37, 41 și 50 kDa. Din acest motiv sunt denumite **P37**, **P41** și **P50**. Liniile P37 și P41 sunt mai intense. Aspectul liniei P50 este cel mai adesea deschis la culoare.

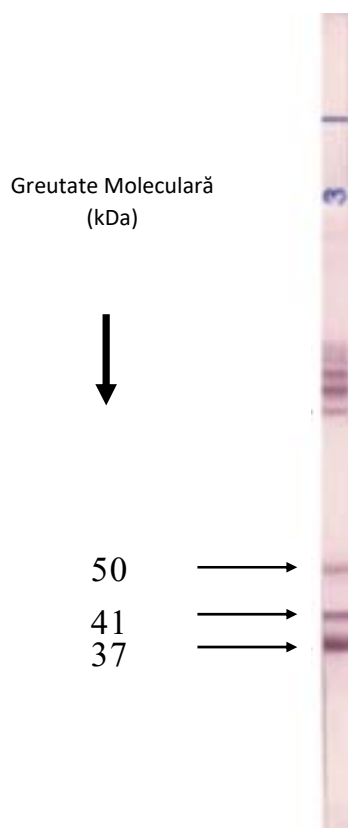


Fig. 1: Exemple de rezultate pozitive.

Profilurile sunt prezentate ca exemple. Benzile sunt marcate cu litera "F" specifică parametrului din lotul "05011".

Interpretare

Prezența **simultană** a celor 3 linii **P37**, **P41** și **P50** este indicator pentru trichineloză.

Pentru a valida rezultatele, întotdeauna comparați profilul imunoblotului fiecărui eșantion cu cel al matorului pozitiv R10. Aspectul liniilor este important la interpretarea testului.

LIMITARI DE UTILIZARE

- Diagnosticul unei boli infecțioase nu poate fi stabilit pe baza unui singur rezultat al testului.
- Rezultatele serologice trebuie interpretate în funcție de informațiile disponibile (de exemplu, epidemiologie, clinică, imagistică, biologie etc.) pentru a stabili un diagnostic. Acestea nu ar trebui să fie folosite ca bază de diagnostic doar pe baza pozitivității lor.

PERFORMANTE (vezi referințele literaturii)

Evaluarea performanței kitului **TRICHINELLA ES WB IgG** (antigen *T. spiralis* **ES**) a fost făcută într-un laborator independent și comparat cu versiunea anterioară a kitului de diagnosticare LDBIO (TRICHINELLA WB IgG - **antigen total**) considerat în continuare WB DE REFERINȚĂ pus în vânzare încă din 2001.

Sensibilitate (Se)

Eșantionul studiat corespunde la 80 de seruri de la pacienți suferind de trichineloză clinică.

Sensibilitatea WB de referință = **98,7%**.

Sensibilitatea **TRICHINELLA ES WB IgG** = **97,5%**.

Specificitate (Sp)

A fost testată pe 165 seruri provenite de la pacienți cu helmintiază cu probabilitatea de a prezenta reacții încrucișate: Toxocara (34), Schistosoma (34), filaria (5), echinococoză (17) fascioloză (2), strongyloidiază (5), cisticercoză (27), precum și alte patologii autoimune: factor reumatoid (9), anticorpi Autau (32).

Specificitatea WB de referință = **95,7%**.

Specificitatea **TRICHINELLA ES WB IgG** = **96,4%**.

Notă: Un studiu sistematic al 500 de eșantioane provenite de la donatori de sânge au relevat un procent 2,4% a prevalenței de serologii pozitive cu kitul **TRICHINELLA ES WB IgG**. Cu WB de referință procentul era de 6,4%. Aceste rezultate, care adesea au intensități scăzute, dar sunt totuși surprinzătoare, au fost publicate în 2011 în timpul celui de-al 13-lea Congres Internațional despre Trichineloză. Nu s-a găsit încă o explicație.

Concluzie

Corelația dintre TRICHINELLA ES WB IgG și starea clinică este excelentă.

Sensibilitate Se = 97,5% [CI95 91,2 - 98,5%]

Specificitate Sp = 96,4% [CI95 90,4 - 99,6%]

Intervalele de încredere sunt calculate conform metodei Wilson cu corecție de continuitate.

Reproductibilitate

Reproductibilitatea între serii și între loturi a fost testată. În ambele cazuri, corelarea ser la ser în ceea ce privește benzile specifice este excelentă.

Interferențe

Chiar dacă nu s-a observat o reacție încrucișată specială cu serurile hemolizate, icterice sau lipidice, se recomandă interpretarea cu grijă a rezultatelor obținute din utilizarea acestor probe.

DEPISTAREA DEFECTELOR

"Benzile sunt șterse, cu un contrast redus": Anumite seruri cu concentrații scăzute de anticorpi pot da astfel de rezultate.

"Pot fi văzute zone umbrite, mai mult sau mai puțin colorate, ușor difuze": Strip-ul nu a fost complet scufundat într-unul dintre reactivi și nu s-a incubat corect pe toată lungimea sa. Petele pot fi, de asemenea, prezente acolo unde proba a fost depusă, dacă tava nu a fost scuturată după distribuire.

"Zgomotul de fond este semnificativ, ceea ce face ca citirea să fie foarte dificilă": spălările au fost insuficiente sau ultima incubare a fost prea lungă. Aplicați tehnici bune de testare a performanțelor, respectați timpii de spălare și asigurați calitatea apei. Reduceți timpul ultimei incubări. În mod excepțional, anumite seruri pot reacționa într-o manieră nespecifică. Apoi, rezultatul testului imunoblot nu poate fi folosit.

Acest zgomot de fond nespecific poate implica doar o parte din bandă, făcând rezultatele neinterpretabile doar pentru acea parte.

"În timpul ultimei etape de dezvoltare apare un precipitat în soluție": substratul poate, de fapt, să precipite parțial (fulgi negri) în soluție-tampon la sfârșitul dezvoltării. Acest fenomen nu modifică calitatea dezvoltării, care trebuie continuată în mod normal. Ultima spălare cu apă distilată elimină posibilele particule solide prezente.

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., Mergey T., Limonne D., Lureau P. Dupouy-Camet J., « Seroprevalence of *Trichinella* antibodies in blood donors in France. », introduis la 13th ICT (Int. Conf. on Trichinellosis), Changchun, China, 2011.

NOTIFICARE DE ACTUALIZARE - Vă rugăm să citiți cu atenție

DATA ELIBERĂRII	VERSIUNE	REZUMATUL MODIFICĂRIILOR
12/08/2021	Vs 15	Eliminarea avertismentului de securitate R5 - Adresa de e-mail de contact – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs16	Adresă nouă
16/01/2023	Vs17	R6 fără NaN3. Bandă identificată cu litera. Posibilă utilizare de reactivi din loturi diferite.



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