

FASCIOLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro dijagnostički imunoblot test
Poluautomatska / ručna tehnika

#FAS ES-WB24G: 24 testova

#FAS ES-WB12G: 12 testova

#FAS ES-WB96G: 96 testova

UPUTSTVA ZA UPOTREBU

Pronađite više informacija i uputstva za upotrebu na vašem jeziku na našem sajtu
www.ldbiodiagnostics.com



FASCIOLA ES Western Blot IgG



NAMENA

FASCIOLA ES Western Blot (WB) IgG je kvalitativni test za jednokratnu upotrebu serološke IgG dijagnoze imunoblot testom fascioloze namenjen za potvrdno testiranje pozitivnog ili dvosmislenog rezultata dobijenog klasičnim skrining testovima.

PRINCIP TESTA

Western Blot tehnika

Izlučni / sekretorni (ES) antigeni *Fasciola hepatica*, jednom razdvojeni elektroforezom, vezani su elektroblottingom na površinu nitrocelulozne membrane (nazvane transfer) isečene na 24 traka numerisane od 1 do 24.

Sprovođenje testa

Svaki uzorak koji se testira je odvojeno inkubiran sa trakom. Specifična antitela potencijalno prisutna u uzorku selektivno se vezuju za antigene. Alkalna fosfataza-anti humani IgG konjugat se zatim vezuje za vezana antitela. Konačno, imunokompleksi reaguju sa supstratom. Antigeni prepoznati specifičnim antitelima tipa IgG prisutnim u uzorcima otkrivaju se kao ljubičaste poprečne trake.

ISPORUČENI REAGENSI

Podrazumevano: paket od 24 testa (#FAS ES-VB24G)

Kurziv: paket od 12 testova (#FAS ES-WB12G) – **Podebljano:** paket od 96 testova (#FAS ES-WB96G)

ID	Količina	Opis	Sastav
R1	1	Fascikla (i) od 24 (12, 4x24) traka: precut + obojeni standardi. (Svaka fascikla i svaki prenos je identifikovan jedinstvenim serijskim brojem)	Senzibilizovana nitroceluloza. Obojena molekulska težina (kDa): Plava: 250, Plava: 150, Plava: 100, Roze: 75, Plava: 50, Zelena: 37, roze: 25, plava: 20, plava: 15, žuta: 10.
R2	1	Bočica od 30 (30, 125) mL SAMPLE BUFFER (Spreman za upotrebu - ružičasti rastvor).	Pufer + površinski aktivna supstanca.
R3	1	Bočica (e) od 30 (30, 2x60) mL ANTI IgG CONJUGATE (Spreman za upotrebu – plav rastvor).	Pufer + anti-humanu IgG poliklonu serumi konjugirani sa alkalnom fosfatazom + NaN ₃ (<0.1%) + stabilizatori.
R5	1	Bočica od 30 (30, 125) mL SUPSTRATA (Spreman za upotrebu - neprozirna smeđa bočica).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatori.
R6	1	Bočica od 60 (60, 250) mL koncentrata za pranje 10X BUFFER (Da se razblaži 10 puta u destilovanoj vodi - bezbojan rastvor).	Pufer + površinski aktivna supstanca.
R10	1	Epruveta od 100 (100, 2x100) µL POZITIVNOG KONTROLNOG SERUMA (Spreman za upotrebu - crvena kapa).	Pufer + skup ljudskih seruma pozitivnih u <i>Fasciola</i> serologija + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizatori.

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

R2, R3, R5 i R6 su zajednički za sve komplete i imaju jedinstven broj lota u zavisnosti samo od datuma njihove proizvodnje. **Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.**

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Kontakt sa kiselinama oslobađa veoma toksični gas.

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

DODATNI MATERIJAL POTREBAN, ALI NIJE OBEZBEĐEN

- Jedna višekanalna polipropilenska inkubaciona posuda za mini-blots (# WBPP-08 ili ekvivalent).
- Jedna platforma za mešanje imunoblota, jedan vakuumski sistem za tečnosti (kade #WBPP-08 koje isporučujemo mogu se isprazniti jednostavnim okretanjem).
- Epruvete i materijal za izvlačenje uzoraka, graduirani cilindri, prilagođeni kontejneri. Automatske pipete, mikropipete i nastavci za jednokratnu upotrebu (zapremine 10 µL, 1,2 mL i 2 mL).
- Destilovana ili dejonizovana voda. Upijajući papir (npr. Whatman filter papir), prozirna lepljiva traka.
- Rukavice, pinceta za rukovanje trake, sekač ili skalpel, ravan transparentan lenjir.

Napomena: Naši reagensi se mogu koristiti u automatizovanom imunoblot procesoru. Treba voditi računa o mogućim hemijskim kontaminacijama naših reagensa ako se procesor deli sa reagensima drugog proizvođača (poznati primer: kontaminacija od strane TWEEN 20) i bakterijske kontaminacije. Rezervne bočice za procesor. Nakon obrade, ne stavljajte preostale korišćene reagense nazad u originalne bočice.

SKLADIŠTENJE I STABILNOST

Čuvati između 2 i 8 ° C. Reagensi iz kompleta su stabilni do isteka roka trajanja navedenog na spoljnoj kutiji i etiketama bočica. Nemojte koristiti kontaminirane ili zamućene reagense. Pufer za ispiranje razblažen na 1/10 je stabilan 2 meseca na +2 do +8 °C i nedelju dana na sobnoj temperaturi.

MERE PREDOSTROŽNOSTI ZA UPOTREBU

Bezbednost

- Samo za *in vitro* upotrebu. Samo za profesionalnu upotrebu. Samo za tehnički obučeno osoblje. Rukovati u skladu sa dobrim laboratorijskim praksama i razmotriti bilo koji reagens i bilo koji uzorak kao potencijalno toksičan i / ili infektivni.
- Nosite laboratorijski mantil, rukavice i naočare; Nemojte piti, jesti ili pušiti u laboratoriji. Ne pipetirajte ustima.
- Pozitivna kontrola je serum ljudskog porekla koji je inaktiviran za HIV 1 i 2, viruse hepatitisa B i hepatitisa C. Međutim, mora se rukovati kao potencijalno infektivnim proizvodom.
- Supstrat sadrži mešavinu NBT i BCIP, toksičan u kontaktu (koža i sluzokože) i udisanjem.
- Reagensi sadrže natrijum azid koji može da formira eksplozivne metalne soli sa olovom i bakrom. Isperite svako izlivanje vodom.
- Odložite otpad (uzorci, nastavci, epruvete, tečnost za ispiranje, korišćeni reagens ...) u skladu sa dobrim praksama koje se koriste u industriji i važećim propisima u zemlji.
- Svaki ozbiljan incident mora biti predmet izjave proizvođaču i nadležnom organu.

Predostrožnosti

- Pročitajte i interpretirajte rezultate pod direktnim belim svetlom.
- Poželjno je koristiti sve reagense iz iste serije. Ako se koriste različite serije, obezbedite sledljivost.
- Koristite trake u numeričkom redosledu. Ne mešajte trake iz različitih serijskih brojeva; Koristite transfere uzastopno. Uspostavite poseban plan distribucije pre početka testa.
- Ne dodirujte trake prstima; koristite pincetu.
- Reagensi se moraju dobro izmešati pre upotrebe, posebno koncentrisani pufer za ispiranje.
- Zatvorite bočice nakon upotrebe; Nemojte koristiti ako je supstanca slučajno uvedena u reagense. Nemojte koristiti reagens iz bočice koja predstavlja znake curenja. Nemojte koristiti zamućen ili istaložen rastvor.
- Koristite samo nastavke za pipete za jednokratnu upotrebu. Izbegavajte bilo kakvu međukanalnu kontaminaciju. Pazite na formiranje pene ili mehurića u nastavcima pipeta (bakterijska kontaminacija bočica reagensa).
- Posude za inkubaciju čistite samo destilovanom vodom (nikada ne koristite deterdžent ili izbeljivač).
- Izostavljanje uzorka ili distribucija neadekvatnog volumena može učiniti rezultat testa negativnim ili pozitivnim, bez obzira na njegov stvarni status.

KOLEKCIJA PRIMERAKA

Aseptički prikupiti uzorke u suvim epruvetama. Potrebno je najmanje 10 µL seruma.

Držite uzorke na 2-8 °C dok se ne obrade. Ako je potrebno da ih čuvate duže od nedelju dana, zamrznite uzorke na -20 ± 5 °C. Nemojte koristiti kontaminirani uzorak. Izbegavajte zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka više puta.

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

PRIPREMA REAGENSA

Pufer za ispiranje: Za 4 testa, u čistoj boci, razblažite 10 ml koncentrata za pranje 10X (**R6**) u 90 ml destilovane ili dejonizovane vode. Pazite da dobro izmešate razblaženi pufer.

POSTUPAK TESTIRANJA

Nota Bene: Preporučuje se da se izvrši multiparametarsko testiranje (vidi LDBIO imunoblot opseg) kako bi se ograničio broj otvorenih bočica i osigurala bolja kontrola kvaliteta.

1. Pripremite plan distribucije za uzorke i C + pozitivnu kontrolu (**R10**).

Samo korišćenjem ove kontrole test može biti tehnički potvrđen i identifikacija napravljena, za dati serijski broj, specifičnih razvijenih traka. C + traka se ne može koristiti za tumačenje rezultata traka iz boje drugog serijskog broja.

2. Odrežite potreban broj traka (R1) pomoću skalpela i čistog i suvog ravnog prozirnog lenjira, zadržavajući plavu liniju pozicioniranja na trakama: držite trake čvrsto na mestu sa lenjirom i izrežite ih sa strane napreznja (brojevi su vidljivi kroz lenjir).
3. Distribuirati 1.2 ml uzorka pufera (R2) u svakom kanalu u skladu sa utvrđenim planom.
4. Depozit, u svom numeričkom redosledu, numerisane trake u kanalima: Neke trake se rehidriraju na površini pufera za oko 2 minuta, sa brojem vidljivim na vrhu, onda lagano protresite ležište da ih potpuno uronite u pufer.
5. Distribuirajte uzorke i pozitivne kontrole: prema planu distribucije, po stopi od 10 µL po kanalu. Lagano protresite poslužavnik nakon svakog doziranja. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 90 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.
6. Korak ispiranja: Ispraznite sadržaj kanala Pasterovom pipetom ili okretanjem posude za inkubaciju. Raspršite 2 do 3 ml razblaženog pufera za ispiranje u svakom kanalu. Inkubirajte na platformi za mešanje 3 minuta. Ponovite 2 puta, a zatim ispraznite sadržaj kanala. Uverite se da se trake ne okreću tokom ovih koraka.
7. Dispense 1.2 mL anti IgG konjugata (R3) u svaki kanal. Postavite poslužavnik na platformu za mešanje. **Inkubirati 60 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.
8. Korak ispiranja: ponovite korak 6.
9. Distribuirajte 1.2 ml NBT / BCIP supstrata (R5) u svaki od kanala. Postavite na platformu za mešanje i zaštitite od direktne svetlosti. **Inkubirati 60 minuta** ± 5 minuta na 20-26 °C.

Bez obzira na parametar, pratite razvoj boje. Razvoj se može zaustaviti ako boja pozadine trake potamni do tačke u kojoj je teško čitati (kvalitet koraka ispiranja ima fundamentalni uticaj na obojenost pozadine). Imajte na umu da će trake olakšati dok se suše.

10. Zaustavite reakciju aspiracijom supstrata sa Pasterovom pipetom ili okretanjem kade za inkubaciju i doziranjem 2 ml destilovane ili dejonizovane vode u kanalima. Ponovite ovaj poslednji korak ispiranja još jednom.
11. Sušenje traka: Sa kanalima i dalje ispunjenim vodom, uzmite trake po numerisanom kraju pomoću pincete i deponujte ih, sa vidljivim brojem, na upijajući papir Whatman. Ostavite da se osuši na vazduhu. Boja traka će prirodno osvetliti tokom sušenja. Tumačenje se mora izvršiti tek nakon završetka sušenja.
12. Skladištenje: Prenesite trake na list papira, koji će se koristiti za njihovo arhiviranje. Poravnajte plave linije pozicioniranja. Držeći ih na mestu ravnim lenjirom, vrh traka zalepite prozirnou lepljivom trakom.

Za dobro tumačenje, trake moraju biti raspoređene u skladu sa njihovim numeričkim redosledom, razmaknute na maksimalno nekoliko milimetara. Nepouzdanu je upoređivati trake koje su razmaknute daleko (npr. br.2 sa br.15). **Opasno je** (lažni rezultati) upoređivati trake iz različitih kompleta (trake sa različitim serijskim brojevima).

KONTROLA KVALITETA I TUMAČENJE

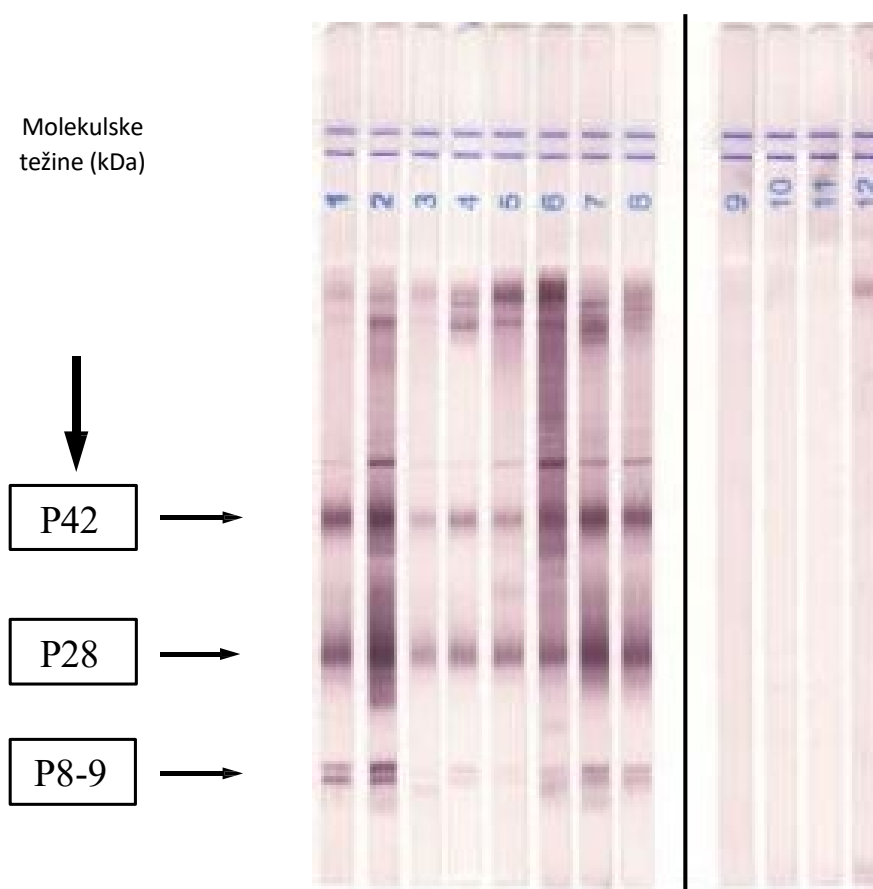
Kontrola seruma (R10) koja se isporučuje sa kompletom mora biti sistematski uključena u bilo koju seriju imunoblota. On pokazuje tipičan profil i omogućava tehničku validaciju dobrog sprovođenja testa (trake moraju da se pojave vrlo jasno na traci) i da precizno kalibrira položaj i aspekt specifičnih traka kako bi se omogućilo tumačenje rezultata traka iz istog lota (isti serijski broj).

Nota Bene: Pozitivna kontrola (R10) profil može da varira u zavisnosti od broja lota reagensa koji se koriste. Odgovarajuće slike su dostupne na našem sajtu www.ldbiodiagnostics.com kao primer.

Opis traka

Pozitivan uzorak može predstaviti brojne trake koje se nalaze između 120 i 7 kDa.

Među manje ili više označenim trakama koje se mogu naći u ovoj oblasti, 3 od njih su posebno odabrane zbog svoje specifičnosti, osetljivosti i lakoće čitanja: dublet na 8-9 kDa, veliki pojas na 28 kDa (često povezan sa uskim pojasom na 25 kDa) i veliki pojas na 42 kDa. Zbog toga se zovu: **P8-9**, **P28** i **P42**.



Sl. 1: Primeri pozitivnih i negativnih rezultata

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

Tumačenje

Istovremeno prisustvo dve trake između **P8-9**, **P28** i **P42** i uključivanje **P28** ukazuje na fasciolozu.

"POZITIVNE" trake iznad pokazuju različite primere specifičnih pronađenih profila.

Da biste potvrdili rezultate, uvek uporedite profil imunoblota svakog uzorka sa profilom pozitivne kontrole R10. Aspekt traka je važan prilikom tumačenja testa.

OGRANIČENJE UPOTREBE

- Dijagnoza zarazne bolesti ne može se utvrditi na osnovu jednog rezultata testa.
- Serološki rezultati moraju se tumačiti u skladu sa dostupnim informacijama (npr. Epidemiologija, klinička, snimanje, biologija ...) kako bi se postavila dijagnoza. Ne treba ih koristiti za postavljanje dijagnoze samo na osnovu njihove pozitivnosti.

UČINAK (vidi literaturu reference str. 9)

Urađeno je procenjivanje **učinka FASCIOLA ES WB IgG** kompleta (*Fasciola hepatica* - **ES antigen**) i upoređena prethodna verzija LDBIO dijagnostičkog kompleta FASCIOLA WB IgG (*Fasciola hepatica* - **Total Antigen**) označen u daljem tekstu: REFERENCE WB koji se prodaje od 2004. godine.

Osetljivost (Se)

Ispitivani uzorak odgovara 75 seruma pacijenata sa sumnjom na kliničku fasciolazu. Ovih 75 seruma su testirani paralelno sa **FASCIOLA ES WB IgG** i REFERENCE WB.

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

Tabela 1: Korelacija FASCIOLA ES WB IgG / WB REFERENCA

Korelacija je odlična (**Se = 100%**)

n = 75			
Priroda specifičnih traka (KDa)	P8-9	P28	P42
Učestalost %	65.3	100.0	100.0

Tabela 2: Učestalost prisustva svakog od specifičnih opsega primećenih na imunoblotima tokom naše studije na 75 pozitivnih uzoraka.

Specifičnost (Sp)

151 seruma parazitskih i gljivičnih infekcija, autoimunih bolesti i davalaca krvi testirano je sa **FASCIOLA ES WB IgG**: *Echinococcus multilocularis* (7), *E.granulosus* (7), *Taenia solium* (cysticercosis) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Shistosoma spp* (14), *Trichinella spiralis* (7), *Tokocara canis* (7), *Strongiloidees stercoralis* (7), malarija (7), *Candida spp* (7), RF + reumatoidni faktor (7), ANA + antinuklearna antitela (7) krv donatori (53).

Specifičnost opsega P8-9, P28 i P42 iz ES antigena je 100%. Trake izvan ovog opsega se ne smatraju specifičnim.

Zaključak

Korespondencija između ove dve tehnike je savršena, a specifičnost kompleta je odlična. U poređenju sa referentnim WB, **Fasciola ES WB IgG WB** komplet ima:

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

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

Intervali pouzdanosti se izračunavaju prema Wilsonovoj metodi sa korekcijom kontinuiteta.

Ponovljivost

Testirana je ponovljivost između serija i između lotova. U oba slučaja, korelacija između seruma u odnosu na određene trake je odlična.

Smetnje

Iako nije primećena posebna unakrsna reakcija sa hemolizovanim, ikteričnim ili lipidnim serumima, preporučuje se pažljivo tumačenje rezultata upotrebe takvih uzoraka.

REŠAVANJE PROBLEMA

"Trake su blede sa malim kontrastom": Određeni serumi sa niskim koncentracijama antitela mogu dati takve rezultate.

"Osenčena područja mogu se videti, više ili manje obojena, blago difuzna": Traka nije bila potpuno potopljena u jedan od reagensa i nije pravilno inkubirala duž cele dužine. Mrlje boje mogu biti prisutne i tamo gde je uzorak deponovan ako poslužavnik nije uzdrman nakon doziranja.

"Pozadinski šum je značajna, što čitanje veoma otežava": Ispiranje je bilo nedovoljno ili je poslednja inkubacija bila preduga. Obezbedite dobre tehnike performansi testa, poštuju vreme ispiranja i obezbedite kvalitet vode. Smanjite vreme poslednje inkubacije. Izuzetno, određeni serumi mogu reagovati na nespecifičan način. Zatim, rezultat imunoblota se ne može koristiti.

Ovaj nespecifičan pozadinski šum može uključivati samo deo trake, čineći rezultate neinterpretabilnim samo za taj deo.

"Talog se pojavljuje u rastvoru tokom poslednjeg koraka razvoja": supstrat može u stvari delimično taložiti (crne pahuljice) u puferu na kraju razvoja. Ovaj fenomen ne menja kvalitet razvoja koji se mora normalno nastaviti. Poslednje ispiranje destilovanom vodom eliminiše moguće prisutne čvrste čestice.

BIBLIOGRAFIJA

- 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.

OBAVEŠTENJE AŽURIRANJA – Molimo vas da pažljivo pročitate

DATUM IZLASKA	VERZIJA	REZIME MODIFIKACIJE
11/08/2021	Vs 17	Uklanjanje sigurnosnog upozorenja R5 - Kontakt adresa e-pošte – NaN ₃ EUH 032.
30/11/2022	Vs 18	Nova adresa
16/01/2023	Vs 19	R6 bez NaN ₃ . Strip identifikovan slovom. Moguća upotreba 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