

TRICHINELLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro diagnostický test Immunoblot
Poloautomatizovaná / manuálna technika

#TRI ES-WB24G: 24 testov

#TRI ES-WB12G: 12 testov

#TRI ES-WB96G: 96 testov

NÁVOD NA POUŽITIE

Viac informácií a návod na použitie vo vašom jazyku nájdete na našej webovej stránke

www.ldbiodiagnostics.com

DOPORUČENÉ POUŽITIE

TRICHINELLA ES Western Blot (WB) IgG je jednorazový kvalitatívny test pro sérologickú diagnózu IgG pomocou imunoblotu. Jedná sa o analýzu trichinelózy určenú pre potvrdzovacie testovanie pozitívnych alebo hraničných výsledkov získaných pomocou klasických skríningových testov.

PRINCÍP TESTU

Technika Western Blot

Antigény vylučované/sekretované (E/S) *T. spiralis*, sa po elektroforetickej separácii naviažu pomocou elektroblotovania na povrch nitrocelulózovej membrány (čo sa nazýva transfer – presun), ktorá sa nastrihá na 24 prúžkov očíslovaných od 1 do 24. .

Vykonanie testu

Každá testovaná vzorka sa oddelene inkubuje s prúžkom. Špecifické protilátky potenciálne prítomné vo vzorke sa selektívne viažu na antigény. Konjugát alkalická fosfatáza-anti-humánny IgG sa potom viaže na naviazané protilátky. Nakoniec imunokomplexy reagujú so substrátom. Antigény, rozpoznávané špecifickými protilátkami typu IgG prítomnými vo vzorkách, sú odhalené ako fialové priečne pruhy.

REAGENCIE DODÁVANÉ SO SÚPRAVOU

Predvolené: balenie 24 testov (#TRI ES-WB24G)

Italic : balenie 12 testov (#TRI ES-WB12G) – **Bold** : balenie 96 testov (#TRI ES-WB96G)

ID	ks	Popis	Zloženie
R1	1	Priečinok (y) 24 (12, 4x24) STRIPS + prefarbené štandardy (každý priečinok a každý prenos je identifikovaný jedinečným sériovým číslom)	Senzitizovaná nitrocelulóza. Farebná molekulová hmotnosť (kDa): modrý: 250, modrý: 150, modrý: 100, ružový: 75, modrý: 50, zelený: 37.
R2	1	Injekčná liekovka s 30 (30, 125) ml VZORIEK VZORKY (pripravený na použitie - ružový roztok).	Pufor + povrchovo aktívna látka.
R3	1	Injekčná liekovka (liekovky) 30 (30, 2x60) ml ANTI IgG CONJUGATE (roztok pripravený na použitie - modrý roztok).	Pufrovacie polyklonálne kozie sérum proti ľudskému IgG konjugované s alkalickou fosfatázou Na ₃ (<0.1%) + stabilizátory.
R5	1	Injekčná liekovka s 30 (30, 125) ml SUBSTRATE (pripravená na použitie - nepriehľadná hnedá liekovka).	Tlmivý roztok + NBT + BCIP + stabilizátory.
R6	1	Injekčná liekovka 60 (60, 250) ml WASH CONCENTRATE 10X BUFFER (zriedi sa 10-krát v destilovanej vode - bezfarebný roztok).	Pufir + povrchovo aktívna látka.
R10	1	Skúmavka 200 (200, 2x200) µl POZITÍVNEHO KONTROLNÉHO SERUMU (pripravený na použitie - červený uzáver).	Zásobný roztok ľudského séra pozitívneho v <i>Trichinella</i> serológia + Na ₃ (<0.1%) + stabilizátory.

R1: Písmeno pred každým číslom pásu je špecifické pre parameter.

R2, R3, R5 and R6 sú spoločné pre všetky zostavy a majú jedinečné číslo šarže v závislosti od dátumu ich výroby. **Odporúča sa vykonať multiparametrové testovanie (pozri rozsah imunoblotov LDBIO), aby sa obmedzil počet otvorených injekčných liekoviek a aby sa zabezpečila lepšia kontrola kvality.**

R10 je kalibrovaný v imunoblote podľa referenčnej šarže a je určený iba pre túto techniku.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032- Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn.

EUH 210 Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov a na našom webe www.ldbiodiagnostics.com.

POTREBNÝ DODATOČNÝ MATERIÁL - NIE JE SÚČASŤOU BALENIA

- Viackanálové polypropylénové inkubačné podnosy pre mini-bloty (# WBPP- 08 or equivalent).
- Hojdacia plošina pre imunoblots, vákuový systém pre kvapaliny (the # WBPP- 08 skúmavky, ktoré dodávame, môžu byť vyprázdnené jednoduchým otočením).
- Skúmavky a materiál na ťahanie vzoriek odmerných valcov, prispôbených kontajnerov. Automatické pipety, mikropipety a jednorazové špičky (objem 25 µl, 1.2 ml and 2 ml).
- Destilovaná alebo deionizovaná voda. Absorpčný papier (e.g., Whatman filter paper), transparentná lepiaca páska.
- Rukavice, pinzeta na manipuláciu s prúžkami, rezačkou alebo skalpelom, ploché priehľadné pravítko.

Poznámka : Naše reagenty môžu byť použité v automatizovanom imunoblotovom procesore. **Ak je procesor zdieľaný s činidlami od iného výrobcu** (známy príklad: kontaminácia TWEEN 20) **a bakteriálne kontaminácie**, je potrebné venovať pozornosť možným chemickým kontamináciám našich činidiel. Rezervovať skúmavky pre procesor. Po spracovaní nedávajte zostávajúce použité reagenty späť do pôvodných injekčných liekoviek.

SKLADOVANIE A STABILITA

Skladujte v rozmedzí 2 až 8°C. Reagenty zo súpravy sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na vonkajšom obale a štítkoch injekčnej liekovky. Nepoužívajte kontaminované alebo zakalené činidlo. Premývací pufer zriedený na 1/10 je stabilný 2 mesiace pri 2 až 8°C alebo jeden týždeň pri izbovej teplote.

BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Bezpečnosť

- Len na použitie *in vitro*. Len na profesionálne použitie. Iba pre technicky vyškolený personál. Manipulujte v súlade so správnou laboratórnou praxou a akékoľvek činidlo a akúkoľvek vzorku považujte za potenciálne toxické a / alebo infekčné
- Používajte laboratórny plášť, rukavice a okuliare; v laboratóriu nepite, nejedzte ani nefajčite.
- Pozitívnu kontrolou je sérum ľudského pôvodu, ktoré bolo inaktivované na vírusy HIV 1 a 2, hepatitídu B a hepatitídu C. So substrátom sa však musí zaobchádzať ako s potenciálne infekčným produktom
- Substrát obsahuje zmes NBT a BCIP, jedovatý pri kontakte (pokožka a sliznice) a pri vdýchnutí
- Činidlá obsahujú azid sodný, ktorý môže tvoriť výbušné kovové soli s olovom a meďou. Rozliaty materiál opláchnite vodou.
- Zlikvidujte odpad (vzorky, špičky, skúmavky, premývaciu kvapalinu, použité činidlo ...) v súlade s osvedčenými postupmi používanými v priemysle a platnými predpismi v krajine.
- Akákoľvek vážna nehoda musí byť predmetom vyhlásenia pre výrobcu a príslušného orgánu.

Prevenencia

- Výsledky čítajte a interpretujte pod priamym bielym svetlom.
- Je vhodnejšie použiť všetky činidlá z tej istej šarže. Ak sa používajú rôzne šarže, zabezpečte sledovateľnosť.
- Prúžky používajte v číselnom poradí. Nemiešajte prúžky z rôznych sériových čísel; použiť prevody po sebe. Pred začatím testu vytvorte špecifický distribučný plán
- Nedotýkajte sa prúžkov prstami;
- Pred použitím sa musia reagenty dobre premiešať, najmä koncentrovaný premývací tlmivý roztok
- Uzatvoriť injekčné liekovky po použití; nepoužívajte, ak bola látka náhodne vložená do činidiel. Nepoužívajte reagentiu z injekčnej liekovky, ktorá vykazuje známky úniku. Nepoužívajte zakalený alebo vyzrážaný roztok
- Používajte iba jednorazové špičky pipiet. Vyhnite sa akejkoľvek medzikanálovej kontaminácii. Dávajte pozor na tvorbu peny alebo bublín v špičkách pipiet (bakteriálna kontaminácia reagenčných liekoviek)
- Inkubačné platničky čistite iba destilovanou vodou (nikdy nepoužívajte prací prostriedok alebo bielidlo)
- Vynechanie vzorky alebo distribúcia neprimeraného objemu - výsledok testu záporný alebo pozitívny, bez ohľadu na jeho aktuálny stav.

ODBER VZORIEK

Asepticky odoberajte vzorky do suchých skúmaviek. Vyžaduje sa minimálne 25 µl séra.

Vzorky uchovávajúte pri 2-8°C až do spracovania. Ak sa musia skladovať dlhšie ako týždeň, vzorky zmrazte na -20 ± 5 ° C. Nepoužívajte kontaminovanú vzorku. Vzorky zamedzte opakovanému zmrazeniu a rozmrazeniu.*

Napriek tomu, že pri hemolyzovaných, ikterických alebo lipidových sérach nebola pozorovaná žiadna špecifická skrížená reakcia, odporúča sa starostlivo interpretovať výsledky z použitia takýchto vzoriek.

PRÍPRAVA ČINIDIEL

Prachový pufo : Pre 4 testy v čistej fľaši zriedte 10 ml premývacieho koncentráту 10X (R6) v 90 ml destilovanej alebo deionizovanej vody. Buďte opatrní pri miešaní zriedeného tlmivého roztoku.

SKÚŠOBNÝ POSTUP

Nota Bene: Odporúča sa vykonať multiparametrické testovanie (pozri rozsah imunoblotov LDBIO), aby sa obmedzil počet otvorených injekčných liekoviek a aby sa zabezpečila lepšia kontrola kvality.

1. Pripravte distribučný plán pre vzorky a pozitívnu kontrolu C (R10).

Skúška môže byť technicky overená a identifikovaná len pre dané sériové číslo špecifických vyvinutých pásiem. AC pásik nie je možné použiť na interpretáciu výsledkov prúžkov z blotu iného sériového čísla.

2. Získajte požadovaný počet prúžkov (R1) skalpelom a čistým a suchým plochým priehľadným pravítkom, ohranjanje modre črte za pozicioniranje na trakovih : pásy držte pásy pevne na mieste s pravítkom a odrežte ich na strane kmeňa (čísla sú viditeľné cez pravítko).

3. Rozdeľte 1,2 ml vzorkového pufru (R2) v každom kanáli podľa stanoveného plánu.

4. Vkladajte očíslované prúžky v kanáloch v ich číselnom poradí: Nechajte prúžky rehydratovať na povrchu po dobu približne 1 minút, s číslom viditeľným na vrchu, POTOM jemne pretrepte zásobník, aby sa úplne ponorili do pufru.

5. Rozdeľte vzorky a pozitívnu kontrolu (-y): podľa distribučného plánu rýchlosťou 25 µl na kanál. Zásobník po každom vydaní jemne pretrepte. Podnos umiestnite na hojdačku.

Inkubujte 90 min ± 5 min pri 20-26 °C.

6. Krok premývania: Vyprázdňte obsah kanálov Pasteurovou pipetou alebo otočením inkubačnej misky. Do každého kanála sa napipetujú 2 až 3 ml zriedeného premývacieho pufru. Inkubujte 3 minúty na húpavej plošine. Opakujte 2 krát a potom vyprázdňte obsah kanálov. Uistite sa, že sa prúžky počas týchto krokov neotáčajú.

7. Do každého kanála sa pridá 1,2 ml konjugátu anti IgG (R3). Umiestnite podnos na hojdačku. **Inkubujte** 60 min ± 5 min pri 20-26 °C.

8. Krok premývania: opakujte krok 6.

9. Rozdeľte 1,2 ml substrátu NBT / BCIP (R5) do každého z kanálov. Umiestnite na hojdačku a chráňte pred priamym svetlom. **Inkubujte** 60 min ± 5 min pri 20-26 °C.

Bez ohľadu na parameter sledujte vývoj farby. Vývoj môže byť zastavený, ak farba pozadia pásu stmavne do miesta, kde je čítanie obtiažne (kvalita krokov prania má zásadný vplyv na sfarbenie pozadia). Všimnite si, že prúžky sa zosvetlia, keď sú suché.

10. Zastavte reakciu odsatím substrátu pomocou Pasteurovej pipety alebo otočením inkubačnej vane a vydávaním 2 ml destilovanej vody do kanálov. Tento posledný premývací krok zopakujte ešte raz.

11. Odstránenie pásov: S kanálmi, ktoré sú ešte naplnené vodou, odoberte prúžky pomocou očíslovaného konca pomocou pinziet a uložte ich s viditeľným číslom na absorpčný papier Whatman. Nechajte vyschnúť na vzduchu. Farba pásov sa prirodzene zosvetlí pri sušení. Interpretácia sa musí vykonať len po ukončení sušenia.

12. Skladovanie: Prúžky preneste na list papiera, ktorý sa použije na ich archiváciu. Zarovnajzte polohovacie čiary. Uchovávajte ich na mieste s plochým pravítkom, prilepte vrchnú časť pásov transparentnou lepiacou páskou.

Pre dobrú interpretáciu musia byť prúžky usporiadané v rade v ich číselnom poradí, rozmiestnené maximálne od seba niekoľko milimetrov. Je nespoľahlivé porovnávať prúžky, ktoré sú od seba vzdialené (napr. č.2 s č.15). **Je nebezpečné** porovnávať prúžky z rôznych súprav (prúžky s rôznymi sériovými číslami) (falošné výsledky).

KONTROLA KVALITY A INTERPRETÁCIA

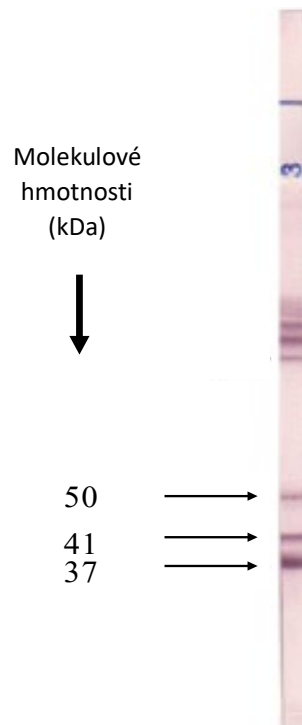
Sérová kontrola (R10) dodaná so súpravou musí byť systematicky zahrnutá v každej sérii imunoblotov. Ukazuje typický profil a umožňuje technické overenie dobrého priebehu skúšky (pásky sa musia na prúžku objaviť veľmi jasne) a presne kalibrovať polohu a aspekt špecifických pásov, aby sa umožnila interpretácia výsledkov pásov z rovnakých testov (rovnaké sériové číslo).

Poznámka: Poznámka: Profil pozitívnej kontroly (R10) sa môže líšiť podľa druhu šarží použitých reagensí. Zodpovedajúce obrázky sú dostupné napríklad na našej webovej stránke www.ldbiodiagnostics.com.

Popis pásiem

Pozitívna vzorka vykazuje bandy nachádzajúce sa medzi 37 a 140 kDa. V praxi a z dôvodov špecificity sa pre meranie vyberá iba rozsah nízkej molekulovej hmotnosti (37 and 50 kDa).

Systematicky sú prítomné tieto 3 bandy: 37, 41 a 50 kDa, a preto sa nazývajú: **P37, P41 a P50**. Bandy P37 a P41 sú intenzívnejšie. Vzhľad bandu P50 band býva dosť často bledý.



Obr. 1: Príklad pozitívneho výsledku

Profily sú uvedené ako príklad. prúžky sú označené písmenom "F" špecifickým pre parameter šarže "05011".

Interpretácia

Simultánna prítomnosť **P37, P41 and P50** bandov udáva trichinelózu.

Na potvrdenie výsledkov vždy porovnajte profil imunoblotu každej vzorky s profilom R10 pozitívnej kontroly. Pri interpretácii testu je dôležitý aspekt pásov.

OBMEDZENIA POUŽÍVANIA

- Diagnózu infekčného ochorenia nemožno stanoviť na základe jediného výsledku testu.
- Sérologické výsledky sa musia interpretovať podľa dostupných informácií (napr. Epidemiológia, klinický obraz, zobrazovanie, biológia atď.) S cieľom stanoviť diagnózu. Nemali by sa používať na stanovenie diagnózy iba na základe ich pozitivity.

CHARAKTERISTIKA (POZRI ODKAZY NA LITERATÚRU)

Vyhodnotenie činnosti kitu **Trichinella ES WB IgG** (antigén *Trichinella spiralis ES*) bolo vykonané nezávislým laboratóriom porovnaním predchádzajúcej verzie LDBIO Diagnostického kitu (Trichinella WB IgG - total antigen) ďalej označovanej ako REFERENČNÝ WBY predávanej od roku 2001.

Senzitivity (Se)

Skúmaná vzorka odpovedala 80 séram od pacientov trpiacich klinickou trichinelózou.

Senzitivita referenčného WB = **98.8%**

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

Špecificita (Sp)

Bola testovaná na 165 vzorkách séra od pacientov vykazujúcich helmintiázy, ktoré by mohli spôsobovať skrížené reakcie: toxokariáza (34), Schistosomiáza (34), filariáza (5), echinokokóza (17) fasciolóza (2), strongyloidiáza (5), cysticerkóza (27), ako aj iné autoimunitné patológie: reumatoidný faktor (9), auto-protilátky (32).

Specificity of the reference WB = **95.7%**

Specificity of Trichinella ES WB IgG = **96.4%**

Note: A systematic study of 500 samples from blood donors revealed a 2.4% prevalence of positive serologies with the **Trichinella ES WB IgG kit**. It is 6.4% with the reference WB. These results, which often have weak intensities but are nevertheless surprising, were published in 2011 during the 13th ICT (International Congress on Trichinellosis). An explanation has yet to be found.

Conclusion

The correlation between WB Trichinella ES IgG and clinical status is excellent.

Senzitivita Se = 97.5% [95CI 91.2 - 98.5%]

Špecificita Sp = 96.4% [95CI 90.4 - 99.6%]

Intervaly spoľahlivosti boli vypočítané podľa Wilsonovej metódy s korekciou pre kontinuitu.

Presnosť

Bola testovaná reprodukovateľnosť medzi sérami a medzisložkami. V oboch prípadoch je korelácia séra na sérum vzhľadom na špecifické pásy vynikajúca.

Interferencia

Napriek tomu, že pri hemolyzovaných, ikterických alebo lipidových sérach nebola pozorovaná žiadna špecifická skrížená reakcia, odporúča sa starostlivo interpretovať výsledky z použitia takýchto vzoriek.

RIEŠENIE PROBLÉMOV

"Pásy sú bledé s malým kontrastom" : Niektoré séra s nízkymi koncentráciami protilátok môžu poskytnúť takéto

výsledky.

"Tieňované oblasti môžu byť viditeľné, viac či menej farebné, mierne difúzne" : Pás nebol úplne ponorený v jednom z činidiel a neinkuboval sa správne po celej jeho dĺžke. Môžu byť prítomné aj škvrny tam, kde bola vzorka uložená, ak sa tácka po dávkovaní neotrela.

"Šum v pozadí je značný, čo robí čítanie veľmi ťažké" : Umývanie bolo nedostatočné alebo posledná inkubácia bola príliš dlhá. Zabezpečte dobré techniky testovania, rešpektujte časy prania a zabezpečte kvalitu vody. Znížte čas poslednej inkubácie.

Výnimočne môžu určité séra reagovať nešpecifickým spôsobom. Potom nie je možné použiť výsledok imunoblotu.

Tento nešpecifický šum pozadia môže zahŕňať iba časť pásu, čo robí výsledky neinterpretovateľnými len pre túto časť.

"V poslednom kroku vývoja sa v roztoku objaví zrazenina" : substrát sa môže na konci vývoja čiastočne vyzrážať (čierne vločky) v pufrí. Tento jav nemení kvalitu vývoja, ktorý musí normálne pokračovať. Posledné premytie destilovanou vodou eliminuje možné prítomné pevné častice.

BIBLIOGRAFIJA

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. Nöckler, « 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. », présenté à 13th ICT (Int. Conf. on Trichinellosis), Changchun, China, 2011.

Upozornenie na aktualizáciu - Prečítajte si pozorne

DATUM VYDANIA	VERZIA	ZHRNUTIE UPRAV
12/08/2021	Vs 15	Odstránenie bezpečnostného varovania R5 - Kontaktná emailová adresa – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs16	Nová adresa
16/01/2023	Vs17	R6 bez NaN3. Pásik označený písmenom D. Možné použitie činidiel z rôznych 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