

CE



CYSTICERCOSIS

Western Blot IgG

In vitro diagnostični imunoblotski test
Polavtomatska / ročna tehnika

#CYS-WB24G: 24 testov

#CYS-WB12G: 12 testov

#CYS-WB96G: 96 testov

NAVODILA ZA UPORABO

Poščite več informacij in navodila za uporabo v svojem jeziku na naši spletni strani
www.ldbioidagnostics.com

PREDVIDENA UPORABA

CYSTICERCOSIS Western blot (WB) IgG je kvalitativni test za enkratno uporabo serološke IgG diagnoze imunoblot testom cisticerkoze, ki je namenjen potrditvenemu testiranju pozitivnega ali dvoumnega rezultata, pridobljenega s klasičnimi presejalnimi testi. Izvede se lahko na serumih ali likvorju (CSF).

NAČELO TESTA

Western Blot tehnika

Z elektroforezo ločeni antigeni (ekstrakt *Taenia solium* cysticerci prašičjega izvora) se preko električnega blotinga vežejo na površino nitrocelulozne membrane (t.i. prenos), ki je razrezana na 24 trakov, oštevilčenih od 1 do 24.

Izvedba testa

Vsek vzorec za individualno testiranje je ločeno inkubiran s trakom. Specifična protitelesa, ki so lahko prisotna v vzorcu, se selektivno vežejo na antigene. Konjugat alkalna fosfataza-proti človeški IgG se nato veže na vezana protitelesa. Končno imunokompleksi reagirajo s substrati. Antigeni, ki jih prepoznajo specifična protitelesa tipa IgG, prisotna v vzorcih, se pokažejo kot vijolične prečne črte.

REAGENTI SO VKLJUČENI V KOMPLET

Privzeto: paket 24 testov (#CYS-WB24G)

Ležeče: paket 12 testov (#CYS-WB12G) – krepko: Paket **96 testov** (#CYS-WB96G).

ID	Količina	Opis	Sestava
R1	1	Mapa/mape s 24 (12, 4 x 24) TRAKOI: razrezani + obarvani, standardni. (Vsaka mapa in vsak prenos ima enkratno identifikacijsko serijsko številko)	Senzibilizirana nitroceluloza. Obarvana molekulska masa (kDa): Modra: 250, modra: 150, modra: 100, rožnata: 75, modra: 50, zelena: 37, rožnata: 25, modra: 20, modra: 15, rumena: 10.
R2	1	Viala s 30 (30, 125) ml VZORČNEGA PUFRA (pripravljen za uporabo – rožnata raztopina).	Pufer + površinsko aktivna snov + NaN3 (< 0,1 %).
R3	1	Viala/viale s 30 (30, 2 x 60) ml KONJUGATA PROTI IgG (pripravljen za uporabo – modra raztopina).	Pufer + poliklonalni serumi kozjega izvora s proti človeškim IgG, konjugirani z alkalno fosfatazo + NaN3 (< 0,1 %) + stabilizatorji.
R5	1	Viala s 30 (30, 125) ml SUBSTRATA (pripravljen za uporabo – motno rjava viala).	Pufer + NBT + BCIP + stabilizatorji.
R6	1	Viala s 60 (60, 250) ml 10-KRATNI KONCENTRAT PUFRA ZA PRANJE <u>(10-krat ga razredčite v destilirani vodi – brezbarvna raztopina).</u>	Pufer + površinsko aktivna snov.
R10	1	Epruveta z 200 (200, 2 x 200) µl SERUMA ZA POZITIVNO KONTROLU (pripravljen za uporabo – rdeč zamašek).	Pufer + zbiri človeškega seruma s pozitivno serologijo na cisticerkozo + NaN3 (< 0,1 %) + stabilizatorji.

R1: A letra antes de cada número de tira é específica para o parâmetro.

R2, R3, R5 in R6 so skupni vsem kompletom in imajo enkratno serijsko številko, ki je odvisna od datuma njihove proizvodnje. **Priporočamo, da z namenom omejitve števila odprtih vial in zagotavljanja boljšega nadzora kakovosti izvedete večparametrsko testiranje (glejte LDBIO obseg imunoblot testa).**

R10 je umerjen v imunoblotu v skladu z referenčno serijo in je namenjen samo tej tehniki.

R3, R10 (NaN3): EUH 032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

EUH 210 Varnosti list na voljo na zahtevo in na naši spletni strani www.ldbiagnostics.com.

ZAHTEVANI SO DODATNI MATERIALI, KI NISO PRILOŽENI

- Večkanalni inkubacijski pladnji iz polipropilena za mini blot teste (# WBPP- 08 ali enakovredno).
- Stresalna plošča za imunoblot teste, vakuumski sistem za tekočine (priložene kadi # WBPP- 08 lahko preprosto izpraznite tako, da jih preobrnete).
- Epruvete in materiali za odvzem vzorcev, jeklenke, prilagojeni vsebniki.
Samodejne pipete, mikropipete in konice za enkratno uporabo (prostornine 25 µl, 1,2 ml in 2 ml).
- Destilirana ali deionizirana voda. Vpojni papir (npr. Whatmanov filtrirni papir), prozoren lepilni trak.
- Rokavice, pinceta za ravnanje s trakovi, rezilo ali skalpel, prozorno ploščato ravnilo.

Opomba: Naše reagente je mogoče uporabljati v avtomatskem procesorju za izvedbo imunoblot testov. **Če v procesorju hkrati uporabljate reagente drugih proizvajalcev, pazite, da ne pride do kemične ali bakterijske kontaminacije naših reagentov** (znan primer: kontaminacija s TWEEN 20). Za procesor rezervirajte posebne viale. Po obdelavi uporabljenih reagentov ne shranujte v izvorne viale.

HRAMBA IN STABILNOST

Hranite med 2 in 8 °C. Reagenti iz kompleta so stabilni do roka trajanja, ki je naveden na zunanjem delu škatle in na oznakah na vialah. Ne uporabljajte kontaminiranega ali motnega reagenta. Pufer za pranje, razredčen na 1/10, je stabilen 2 meseca pri temperaturi od +2 do +8 °C ter en teden pri sobni temperaturi.

PREVIDNOSTNI UKREPI PRI UPORABI

Varnost

- Samo za uporabo *in vitro*. Samo za profesionalno uporabo. Samo za tehnično usposobljeno osebje. S snovmi ravnajte v skladu z Dobrimi laboratorijskimi praksami ter upoštevajte, da je vsak reagent in vsak vzorec lahko strupen in/ali kužen.
- Nosite laboratorijsko haljo, rokavice in zaščitna očala: v laboratoriju ne pijte, jejte ali kadite. Tekočin iz pipet ne prelivajte z usti.
- Pozitivna kontrola je serum človeškega izvora, ki je bil inaktiviran za viruse HIV 1 in 2, hepatitis B in hepatitis C. Kljub temu z njim ravnajte kot s potencialno kužnim proizvodom.
- Substrat vsebuje mešanico NBT in BCIP ter je strupen ob stiku (s kožo in sluznicami) in ob vdihavanju.
- Reagenti vsebujejo natrijev azid, ki lahko s svincem in bakrom tvori eksplozivne kovinske soli. Če polijete katero koli izmed snovi, jo izperite z vodo.
- Odpadke (vzorce, konice, epruvete, tekočino za pranje, rabljene reagente idr.) zavrzite v skladu z dobrimi sektorskimi praksami in aktualnimi predpisi, ki veljajo v državi.
- Vsak resen incident mora biti predmet prijave proizvajalcu in pristojnemu organu.

Previdnostni ukrepi

- Rezultate preberite in interpretirajte pod direktno belo svetlobo.
- Zaželeno je, da uporabite vse reagente iz iste serije. Če uporabljate različne serije, zagotovite sledljivost.
- Trakove uporabljajte v številčnem zaporedju. Ne mešajte trakov z različnimi serijskimi številkami; prenose uporabite enega za drugim. Pred začetkom testiranja določite specifičen načrt distribucije.
- Trakov se ne dotikajte s prsti – uporabite pinceto.
- Reagente pred uporabo dobro premešajte, zlasti koncentrirani pufer za pranje.
- Viale po uporabi zamašite; ne uporabljajte jih, če je bila v reagente pomotoma vnešena snov. Ne uporabljajte reagenta iz viale, ki kaže znake puščanja. Ne uporabljajte motne ali oborjene raztopine.
- Uporabljajte zgolj konice pipet za enkratno uporabo. Preprečite vsakršno kontaminacijo med kanali.
Prepričajte se, da se na konicah pipet ne delajo pena ali mehurčki (bakterijska kontaminacija vial z reagenti).
- Inkubacijske pladnje čistite samo z destilirano vodo (nikoli z detergentom ali belilom).
- Če spustite vzorec ali razdelite neprimerno količino, lahko rezultat negativnega ali pozitivnega testa, ne glede na njegovo dejansko stanje.

ODVZEM VZORCEV

Vzorce aseptično odvzemite v suhe epruvete. Potrebovali boste najmanj 25 µl seruma ali CSF. V primeru CSF bo odvzem 50 µl povečal občutljivost testa.

Do obdelave hranite vzorce pri temperaturi 2–8 °C. Če je treba vzorce hraniti več kot en teden, zamrnjite pri -20 ± 5 °C. Ne uporabljajte kontaminiranih vzorcev. Izogibajte se večkratnemu zamrzovanju in odmrzovanju vzorcev.

Čeprav pri hemoliziranem, zlateničnem ali lipidnem serumu ni bila opažena nikakršna navzkrižna reakcija, pri rezultatih uporabe tovrstnih vzorcev svetujemo skrbno interpretacijo.

PRIPRAVA REAGENTOV

Pufer za pranje: Za 4 teste v čisti posodi 10-krat razredčite 10 ml koncentrata za pranje (**R6**) v 90 ml destilirane ali deionizirane vode. Pazite, da razredčeni pufer dobro premešate.

POSTOPEK IZVEDBE TESTA

Zapomnite si: Priporočamo, da z namenom omejitve števila odprtih vial in zagotavljanja boljšega nadzora kakovosti izvedete večparametrsko testiranje (glejte LDBIO obseg imunoblot testa).

1. Za vzorce in pozitivno kontrolo C+ (**R10**) pripravite načrt distribucije.

Test je lahko za določeno serijsko številko glede na specifične razvite trakove tehnično ovrednoten in identificiran le, če uporabite to kontrolo. Traku C+ ni mogoče uporabiti za interpretacijo rezultatov blot testa na traku z drugo serijsko številko.

2. Zahtevano število trakov (R1) izrežite s skalpelom ter čistim in suhim ploskim, prozornim ravnilom, pri čemer modro pozicijsko črto držite na trakovih: s pomočjo ravnila trakove trdno pridržite na mestu in jih odrežite na strani upogiba (številke lahko vidite skozi ravnilo).
3. V vsak kanal vnesite 1,2 ml vzorčnega pufra (R2) v skladu z načrtom.
4. Oštevilčene trakove po številčnem redu položite v kanale: Dovolite, da se trakovi rehidrirajo na površini pufra približno 2 minuti, pri čemer naj bodo njihove številke vidne na vrhu, NATO nežno stresite pladenj in zagotovite, da se trakovi popolnoma potopijo v pufer.
5. Razdelite vzorce in pozitivno kontrolo/kontrole: po načrtu distribucije in v odmerku 25 µl na kanal (v primeru CSF raje 50 µl). Po vsakem vnosu nežno stresite pladenj.
Pladenj položite na stresalno ploščo.
 - Serum: **Inkubirajte 90 min. ± 5 min.** pri 20-26 °C.
 - CSF: **inkubirajte preko noči (16 ur +/- 2 uri)** pri 20-26 °C. Da se izognete izsušitvi, morate inkubacijski pladenj pokriti s folijo.
6. Pranje: Vsebino kanalov odstranite s Pasteurjevo pipeto ali tako, da preobrnete inkubacijski pladenj. V vsak kanal vnesite 2 do 3 ml razredčenega pufra za pranje. Na stresalni plošči inkubirajte 3 minute. Ponovite 2-krat in izpraznite kanale. Pazite, da se pri izvajanju teh korakov trakovi ne obračajo.
7. V vsak kanal vnesite 1,2 ml konjugata proti anti IgG (R3). Pladenj položite na stresalno ploščo.
Inkubirajte 60 min. ± 5 min. pri 20-26 °C.
8. Pranje: ponovite 6. korak.
9. V vsak kanal vnesite 1,2 ml substrata NBT/BCIP (R5). Pladenj položite na stresalno ploščo in ga zaščitite pred neposredno svetlobo. **Inkubirajte 60 min. ± 5 min.** pri 20-26 °C.
10. Reakcijo ustavite z aspiracijo substrata s Pasteurjevo pipeto ali tako, da preobrnete inkubacijsko kad, ter v kanale vlijte 2 ml destilirane vode. Zadnji korak pranja ponovite še enkrat.
11. Sušenje trakov: Ko je v kanalih še voda, s pinceto zgrabite trakove na oštevilčenem koncu in jih položite na Whatmanov filtrirni papir tako, da številka ostane vidna. Pustite, naj se posušijo na zraku. Med sušenjem bodo trakovi naravno postali svetlejši. Trakove lahko interpretirate šele, ko se popolnoma posušijo.
12. Hramba: Trakove prenesite na list papirja, ki bo uporabljen za arhiviranje. Poravnajte pozicijske črte. Vrhni del trakov pridržite na mestu s ploskim ravnilom in jih pritrdite s prozornim lepilnim trakom.

Za uspešno interpretacijo trakov jih uredite glede na prenos in po številčnem redu ter največ nekaj milimetrov narazen. Primerjava trakov, ki so nameščeni daleč stran drug od drugega (npr. trak št. 2 in trak št. 15), ni zanesljiva. Primerjava trakov iz različnih kompletov (z različnimi serijskimi številkami) **ni varna** (prikažejo se lahko lažni rezultati).

NADZOR KAKOVOSTI IN INTERPRETACIJA

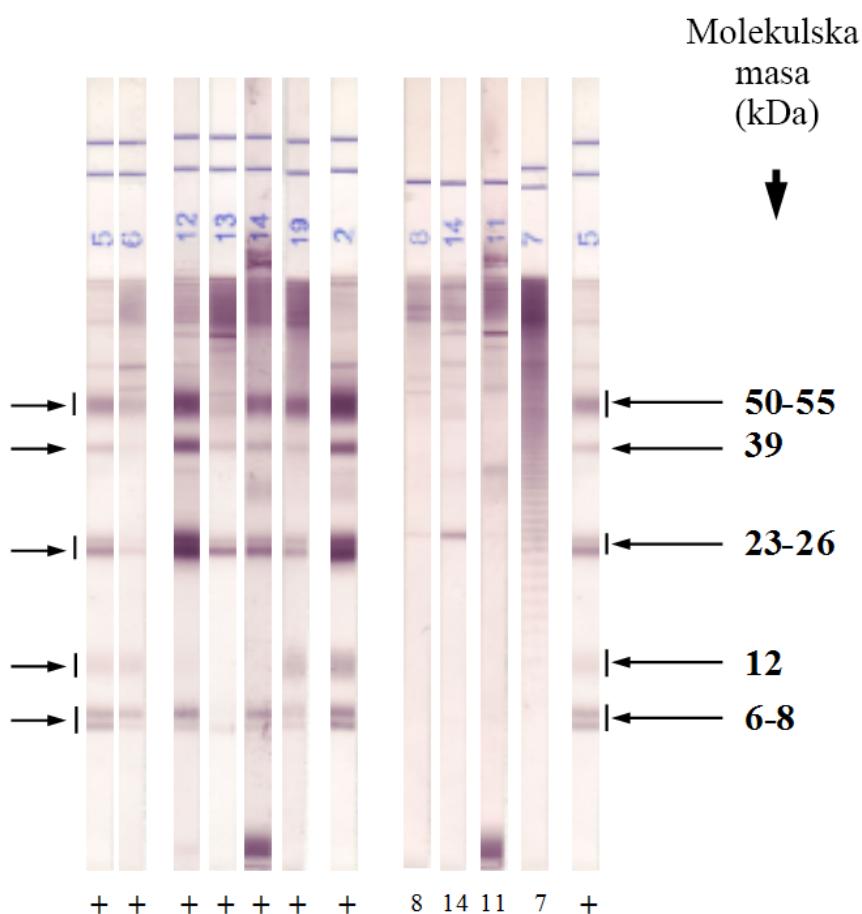
Serumsko kontrolo (R10) v kompletu morate sistematično vključiti v vsako serijo imunoblot testov. Kontrola prikazuje tipični profil in omogoča tehnično vrednotenje ustrezone izvedbe testa (črte, ki se pojavi na trakovih, morajo biti zelo jasno vidne) ter točno kalibracijo položaja in videza določenih črt, kar predstavlja temelj za interpretacijo rezultatov s trakov v istem prenosu (z isto serijsko številko).

Nota Bene: Profil pozitivne kontrole (R10) se lahko razlikuje glede na število partij uporabljenih reagentov. Ustrezne slike so na primer na našem spletnem mestu www.ldbiagnostics.com.

Opis trakov

V primeru pozitivnega vzorca se lahko med 2 in 200 kilodaltoni (kDa) prikažejo številne črte. V praksi in zaradi specifičnosti se rezultati odčitavajo zgolj v razponu od 6 do 55 kDa.

V tem območju je 5 črt največkrat prisotnih pri naslednjih molekulskih masah (kDa): **6–8, 12, 23–26, 39, 50–55**. Zaradi tega imajo naslednja imena: **P6–8, P12, P23–26, P39 in P50–55**.



Slika 1: Primeri pozitivnih in negativnih rezultatov

Profili so navedeni kot primeri. Trakovi so označeni s črko "E", ki je značilna za parameter iz serije "04010".

Videz črt

Črti **P6–8 in P23–26** se pojavit v obliki ene same velike črte ali dvojne črte. Črta **P50–55** se navadno prikaže v obliki široke črte s precej zbrisano konturo.

Pomembne točke – v praksi (gl. *Slika 1*):

Področji 6–26 kDa in 39–55 kDa sta najbolj specifični, hkrati pa ju je najlažje odčitati in interpretirati.

Vmesno področje (med črtama P23–26 in P39) ni v celoti specifično za cistica (pogoste so navzkrižne reakcije, zlasti z drugimi helmintizami in malarijo *P. falciparum*).

Interpretacija

Prisotnost najmanj **2 izrazito definiranih črt** med 5 zgoraj opisanimi črtami, P6–8, P12, P23–26, P39 in P50–55, nakazuje na cistica v serumu in na nevrocistica v CSF.

Zgornji primeri: »+« = nevrocistica – 8, 14, 11 = hidatidoza 7 = alveolarna ehinokokoza.

Opomba: Trak 7 predstavlja nespecifični »Mikado« videz (prim. § Odpravljanje težav)

Za ovrednotenje rezultatov vselej primerjajte profil imunoblot testa vsakega vzorca s profilom imunoblot testa pozitivne kontrole R10. Pri interpretaciji testov je pomemben videz trakov.

OMEJITVE UPORABE

- Diagnoze kužne bolezni ni mogoče postaviti na podlagi rezultatov enega samega testa.
- Seroški rezultati morajo biti za postavitev diagnoze interpretirani v skladu z razpoložljivimi podatki (npr. z epidemiološkega, kliničnega, biološkega področja, področja zajema slik itd.). Ne smemo jih uporabljati kot podlago za diagnozo samo na podlagi njihove pozitivnosti.

IZVEDBE (GLEJ REFERENCE LITERATURE)

Občutljivost (Se)

Ovrednotenih je bilo 79 vzorcev (70 vzorcev s serumom in 9 s CSF), ki so bili pozitivni po kliničnih, epidemioloških, radioloških in/ali seroloških merilih.

77 vzorcev, vključno z 9 vzorci s CSF, je bilo dokazano pozitivnih. **Občutljivost Se = 97,5 %**

Specifičnost (Sp)

Ovrednotenih je bilo 95 vzorcev, med katerimi je bilo 81 vzorcev seruma bolnikov z naslednjimi okužbami s paraziti: *Toxocara canis* (7), *Trichinella spiralis* (14), *Toxoplasma gondii* (7), filariaza (7), *Fasciola hepatica* (4), *Echinococcus granulosus* (14), *E. multilocularis* (14), *Schistosoma* sp. (14) in 14 vzorcev serumu bolnikov z avtoimunskimi boleznimi: revmatoidni faktor RF+ (7) in protijedrna protitelesa ANA+ (7). Vsi vzorci so bili dokazano negativni. **Specifičnost Sp = 100 %**

Opomba: Nekateri vzorci predstavljajo osamljene, ozke črte, ki jih ne smete zamešati s specifičnimi črtami (prim. primere na str. 5). Ozke črte, ki se na tej ravni včasih pojavijo pri serumu z ehinokokozo, hidatidozo ali shistosomozo, se še posebej razlikujejo od tipičnega izgleda črte **P50–55** (velika in razširjena).

Zaključek

Povezava med cistica WB in kliničnim stanjem je odlična.

Občutljivost = 97,5% [IC95: 90,3 - 99,6%]

Specifičnost = 100% [IC95: 95,1 - 100%]

Intervali zaupanja se izračunajo po Wilsonovi metodi s korekcijo kontinuitete.

Ponovljivost

Testirana je bila ponovljivost znotraj serij in lotov. V obeh primerih je korelacija serum-serum glede specifičnih črt odlična.

Motnje

Čeprav pri hemoliziranem, zlateničnem ali lipidnem serumu ni bila opažena nikakršna navzkrižna reakcija, pri rezultatih uporabe tovrstnih vzorcev svetujemo skrbno interpretacijo.

ODPRAVLJANJE TEŽAV

»**Trakovi so bledi in ne kažejo jasnih kontrastov**«: Tovrstni rezultati so možni pri nekaterih serumih z nizko koncentracijo protiteles.

»**Opaziti je zatemnjena področja, ki so bolj ali manj obarvana in nekoliko razpršena**«: Trak ni bil popolnoma potopljen v enega izmed reagentov, zaradi česar ni bil ustrezno inkubiran po celotni dolžini. Če pladnja po vnosu snovi niste pretresli, se lahko na mestu, kamor je bil vzorec položen, pojavijo tudi madeži.

»**Šum v ozadju je moteč, zaradi česar je odčitavanje izredno zahtevno**«: Pranje ni bilo dovolj izčrpno ali pa je bila zadnja inkubacija predolga. Prepričajte se, da uporabljate ustrezne tehnike izvajanja testa, ter upoštevajte čas pranja in zagotovite vodo visoke kakovosti. Skrajšajte čas zadnje inkubacije. V posebnih primerih lahko nekateri serumi reagirajo na nespecifičen način. Madeži v ozadju so lahko včasih videti kot proge, zaradi katerih je odčitavanje rezultatov imunoblot testa izredno oteženo. V tovrstnih primerih rezultati imunoblot testa niso uporabni.

Ta nespecifični šum v ozadju se lahko pojavi samo na enem delu traku, pri čemer rezultatov ni mogoče odčitati le na tistem delu.

»**Med zadnjim delom spremicanja se v raztopini pojavi oborina**«: ob koncu spremicanja se lahko substrat v pufru dejansko delno obori (nastanejo črne luske). Ta pojav ne vpliva na kakovost spremicanja, s katerim lahko nadaljujete normalno. Zadnje pranje z destilirano vodo odstrani morebitno prisotne trdne delce.

BIBLIOGRAFIJA

- Deckers, Nynke, et Pierre Dorny. 2010. « Immunodiagnosis of *Taenia Solium* Taeniosis/cysticercosis ». *Trends in Parasitology* 26 (3): 137-44. doi:10.1016/j.pt.2009.12.008.
- Del Brutto, Oscar H. 2012. « Diagnostic Criteria for Neurocysticercosis, Revisited ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 299-304. doi:10.1179/2047773212Y.0000000025.
- Dournon, Nathalie, Loïc Epelboin, Marie-Charlotte Brion, Luc Paris, François Bricaire, et Eric Caumes. 2012. « Seroconversion of Neurocysticercosis Occurring After Anti-Helminthic Treatment: Neurocysticercosis With Seroconversion ». *Journal of Travel Medicine* 19 (6): 383-86. doi:10.1111/j.1708-8305.2012.00658.x.
- Garcia, Hector H, Theodore E Nash, et Oscar H Del Brutto. 2014. « Clinical Symptoms, Diagnosis, and Treatment of Neurocysticercosis ». *The Lancet Neurology* 13 (12): 1202-15. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
- Gekeler, F, S Eichenlaub, E G Mendoza, J Sotelo, M Hoelscher, et T Löscher. 2002. « Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis ». *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 21 (3): 227-29. doi:10.1007/s10096-002-0695-3.
- Michelet, Lorraine, Agnès Fleury, Edda Sciutto, Eric Kendjo, Gladis Fragoso, Luc Paris, et Bernard Bouteille. 2011. « Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid ». *Journal of clinical microbiology* 49 (1): 195-200. doi:10.1128/JCM.01554-10.
- Raccourt, C P, P Agnamey, J Boncy, J-H Henrys, et A Totet. 2009. « Seroprevalence of human *Taenia solium* cysticercosis in Haiti ». *Journal of helminthology* 83 (2): 113-16. doi:10.1017/S0022149X09232330.
- Rodriguez, Silvia, Patricia Wilkins, et Pierre Dorny. 2012. « Immunological and Molecular Diagnosis of Cysticercosis ». *Pathogens and Global Health* 106 (5): 286-98. doi:10.1179/2047773212Y.0000000048.
- ŠOba, Barbara, Bojana Beović, Zala Lužnik, Miha Skvarč, et Jernej Logar. 2014. « Evidence of Human Neurocysticercosis in Slovenia ». *Parasitology* 141 (04): 547-53. doi:10.1017/S0031182013001947.
- Van Doorn, H. Rogier, Ellen Wentink-Bonnema, Rob J. Rentenaar, et Tom van Gool. 2007. « Specific Cross-Reactivity in Sera from Cystic Echinococcosis Patients in an Enzyme-Linked Immunoassay for Cysticercosis Diagnostics ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101 (9): 948-50. doi:10.1016/j.trstmh.2007.04.021.

Obvestilo o posodobitvi - Pozorno preberite

DATUM IZDAJE	RAZLIČICA	POVZETEK SPREMEMB
06/08/2021	Vs 19	Odstranitev varnostnega opozorila R5 - Nočni inkubacijski čas - Kontaktni e-poštni naslov – NaN3 EUH032.
30/11/2022	Vs20	Novi naslov
05/04/2023	Vs21	R6 brez NaN3. Trakovi označeni s črko. Možnost uporabe reagentov iz različnih serij.



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostic.com – info@ldbodiag.com