

FASCIOLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro diagnostični imunoblotski test
Polavtomatska / ročna tehnika

#FAS ES-WB24G: 24 testov

#FAS ES-WB12G: 12 testov

#FAS ES-WB96G: 96 testov

NAVODILA ZA UPORABO

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

PREDVIDENA UPORABA

FASCIOLA ES Western Blot (WB) IgG je kvalitativni test za enkratno uporabo serološke IgG diagnoze imunoblot testom fascioleze, ki je namenjen potrditvenemu testiranju pozitivnega ali dvoumnega rezultata, pridobljenega s klasičnimi presejalnimi testi.

NACELO TESTA

Western Blot tehnika

Z elektroforezo ločeni ekskretorni/sekretorni (ES) antigeni parazita *Fasciola hepatica* 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

Vsak 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 VKLJUCENI V KOMPLET

Privzeto: paket 24 testov (#FAS ES-WB24G)

ležeče: paket 12 testov (#FAS ES-WB12G) – **krepko: Paket 96 testov (#FAS ES-WB96G).**

ID	Količina	Opis	Sestava
R1	1	Mapa/mape s 24 (12, 4 x 24) TRAKOVI: 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.
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 + NaN ₃ (< 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 (10-krat ga razredčite v destilirani vodi – brezbarvna raztopina).	Pufer + površinsko aktivna snov.
R10	1	Epruveta s 100 (100, 2 x 100) µl SERUMA ZA POZITIVNO KONTROLO (pripravljen za uporabo – rdeč zamašek).	Pufer + zbirni človeškega seruma s pozitivno serologijo na <i>Fasciola</i> + NaN ₃ (< 0,1 %) + stabilizatorji.

R1: Črka pred vsako številko traku je značilna za parameter.

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).**

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - V stiku s kislinami se sprošča zelo strupen plin.

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

ZAHTEVANI SO DODATNI MATERIALI, KI NISO PRILOZENI

- 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 10 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 vialo. Po obdelavi uporabljenih reagentov ne shranjujte v izvorne vialo.

HRAMBA IN STABILNOST

Hranite med 2 in 8 °C. Reagenti iz kompleta so stabilni do roka trajanja, ki je naveden na zunanem 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 (vzorci, konice, epruvete, tekočino za pranje, rabljene reagente idr.) zavržite 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 vial, 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

Vzorci aseptično odvzemite v suhe epruvete. Potrebovali boste najmanj 10 µl seruma.

Do obdelave hranite vzorce pri temperaturi 2–8 °C. Če je treba vzorce hraniti več kot en teden, zamrznite 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 10 µl na kanal. Po vsakem vnosu nežno stresite pladenj. Pladenj položite na stresalno ploščo. **Inkubirajte 90 min.** ± 5 min. pri 20–26 °C.
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.

Spremljajte spreminjanje barve ne glede na parametre. Spreminjanje barve lahko ustavite, če barva ozadja na traku potemni do točke, ki oteži odčitavanje (kakovost pranja ključno vpliva na obarvanje ozadja). Upoštevajte, da bodo med sušenjem trakovi postali svetlejši.

10. Reakcijo ustavite z aspiracijo substrata s Pasteurjevo pipeto ali tako, da preobrnete inkubacijsko kad, ter v kanale vlijete 2 ml destilirane vode. Zadnji korak pranja ponovite še enkrat.
11. Sušenje trakov: Ko je v kanalih še voda, s pinceto zagrabite 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. Vrhnji 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

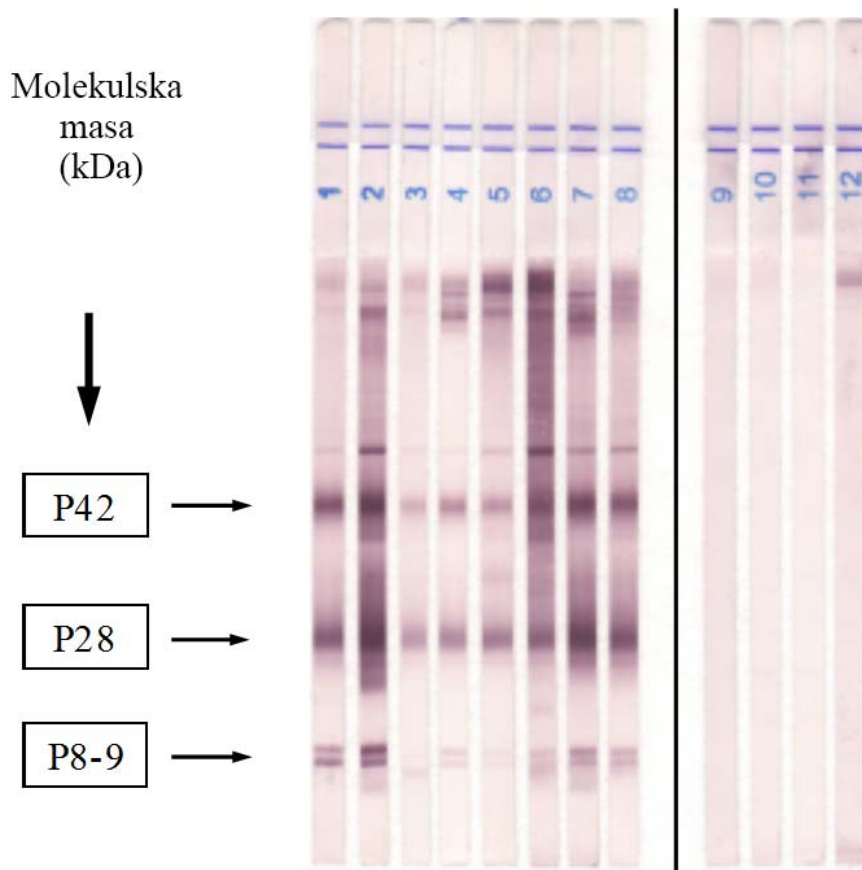
Serumsko kontrolo (R10) v kompletu morate sistematično vključiti v vsako serijo imunoblot testov. Kontrola prikazuje tipični profil in omogoča tehnično vrednotenje ustrezne izvedbe testa (črte, ki se pojavijo na trakovih, morajo biti zelo jasno vidne) ter točno kalibracijo položaja in videza določenih 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.ldbiodiagnostics.com.

Opis trakov

V primeru pozitivnega vzorca se lahko med 120 in 7 kDa prikažejo številne črte.

Med bolj ali manj izrazitimi črtami, ki se pojavijo v tem območju, so bile 3 izbrane zaradi njihove specifičnosti, občutljivosti in preprostega odčitavanja: dvojna črta pri 8–9 kDa, velika črta pri 28 kDa (pogosto povezana z ozko črto pri 25 kDa) in velika črta pri 42 kDa. Zaradi tega imajo naslednja imena: **P8–9, P28 in P42**.



Slika 1: Primeri pozitivnih in negativnih rezultatov

Profili so navedeni kot primeri. Trakovi so označeni s črko "H", ki je značilna za parameter iz serije "07012".

Interpretacija

Hkratna prisotnost dveh črt izmed **P8–9, P28 in P42** ter vključitev **P28** nakazujeta na fasciolozo. Zgornje »POZITIVNE« črte prikazujejo različne primere odkritih specifičnih profilov.

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.
- Serološki 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)

Ovrednotenje učinkovitosti kompleta **FASCIOLA ES WB IgG (antigen parazita *Fasciola hepatica* – E/S)** je bilo izvedeno v primerjavi s predhodno različico LDBIO diagnostičnega kompleta FASCIOLA WB IgG (*Fasciola hepatica* – skupni antigen), v nadaljevanju: REFERENČNI WB, ki je na trgu od leta 2004.

Občutljivost (Se)

Vzorec v študiji vključuje 75 vzorcev seruma bolnikov, pri katerih je obstajal sum na klinično fasciolozo. Teh 75 vzorcev seruma je bilo vzporedno testiranih s kompletoma FASCIOLA E/S WB IgG in REFERENČNIM WB.

n = 75	REFERENČNI WB	FAS ES WB IgG
POZITIVNI	75	75
NEGATIVNI	0	0

Tabela 1: Korelacija FASCIOLA ES WB IgG/WB REFERENČNI Korelacija je odlična (Se = 100 %)

N= 75

Narava specifičnih črt (Kda)	P8-9	P28	P42
Pogostost v %	65,3	100,0	100,0

Tabela 2: Pogostost prisotnosti vsake izmed specifičnih črt, ki so jo v naši študiji 75 pozitivnih vzorcev pokazali imunoblot testi.

Specifičnost

151 vzorcev seruma oseb z okužbami s paraziti in glivicami, oseb z avtoimunskimi boleznimi in krvodajalcev je bilo testiranih s kompletom FASCIOLA E/S WB IgG: *Echinococcus multilocularis* (7), *E. granulosus* (7), *Taenia solium* (cisticerkoza) (14), *Entamoeba histolytica* (7), *Schistosoma* spp (14), *Trichinella spiralis* (7), *Toxocara canis* (7), *Strongyloides stercoralis* (7), malarija (7), *Candida* spp (7), revmatoidni faktor RF+ (7), protijedrna protitelesa ANA+ (7), krvodajalci (53).

Specifičnost črt P8–9, P28 in P42 pri E/S antigenu je 100-odstotna. Črte izven tega razpona ne veljajo za specifične.

Zaključek

Ujemanje teh dveh tehnik je popolno.

V primerjavi z referenčno WB je komplet FASCIOLA ES WB IgG dal naslednje performanse:

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

Sp = 100% [IC95 96,9 - 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 TEZAV

»**Trakovi so blede 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 inkubacije.

Izjemoma lahko določene vrste seruma reagirajo na nespecifičen način. 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 spreminjanja se v raztopini pojavi oborina**«: ob koncu spreminjanja se lahko substrat v pufri dejansko delno obori (nastanejo črne luske). Ta pojav ne vpliva na kakovost spreminjanja, s katerim lahko nadaljujete normalno. Zadnje pranje z destilirano vodo odstrani morebitno prisotne trdne delce.

BIBLIOGRAFIJA

- Agnamey, P, E Fortes-Lopes, C P Raccurt, J Boncy, et A Totet. 2012. « Cross-sectional serological survey of human fascioliasis in haiti ». *Journal of parasitology research* 2012: 751951. doi:10.1155/2012/751951.
- Arafa, M. S., S. M. Abaza, K. A. El-Shewy, E. W. Mohareb, et A. A. El-Moamly. 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, Peter J., Lorenzo Savioli, et Alan Fenwick. 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, Muhammad Kasib, Muhammad Sohail Sajid, Hasan Riaz, Nazia Ehsan Ahmad, Lan He, Muhammad Shahzad, Altaf Hussain, Muhammad Nisar Khan, Zafar Iqbal, et Junlong Zhao. 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, Roberto, Veronica H. Agramunt, Pablo Cuervo, et Santiago Mas-Coma. 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., G. Dreyfuss, B. Bouteille, et M. L. Dardé. 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, M.R., J.W. McGarry, S. Felstead, P. Ortiz, A. Akca, et D.J.L. Williams. 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, Ahmed I., et Shoji Uga. 2014. « Review of Parasitic Zoonoses in Egypt ». *Tropical Medicine and Health* 42 (1): 3-14. doi:10.2149/tmh.2013-23.

Obvestilo o posodobitvi - Pozorno preberite

DATUM IZDAJE	RAZLIČICA	POVZETEK SPREMEMB
11/08/2021	Vs 17	Odstranitev varnostnega opozorila R5 - Kontaktni e-poštni naslov – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs18	Novi naslov
16/01/2023	Vs19	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.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com