

TRICHINELLA ES

CE



Western Blot IgG

In vitro diagnostisk immunoblotanalys
Halvautomatisk / manuell teknik

#TRI ES-WB24G: 24 test

#TRI ES-WB12G: 12 test

#TRI ES-WB96G: 96 test

BRUKSANVISNING

Hitta mer information och IFU på ditt språk på vår webbplats
www.ldbiodiagnostics.com

AVSEDD ANVÄNDNING

TRICHINELLA ES Western Blot (WB) IgG är ett kvalitativt test för engångsbruk för serologisk IgG-diagnos med Immunoblotting-test av trichinellosis avsett för bekräftande test av ett positivt eller tvetydigt resultat erhållet via klassiska screeningtester.

PRINCIPER FÖR TESTET

Western Blotting-teknik

När antigener, utsöndrade (Excreted/Secreted, ES), av *Trichinella spiralis* har separerats via elektrofores binds de via elektroblotting till ytan av ett nitrocellulärt membran (kallat överföring) som har klippts isär till 24 remsor, numrerade 1–24.

Utförande av testet

Varje prov ska testas separat inkuberat med en remsa. De specifika antikropparna som är potentiellt närvarande i provet binds selektivt till antigenerna av sig själva. Det alkaliska fosfatas-antihumana IgG-konjugatet binder därefter sig själv till de bundna antikropparna. Tillslut reagerar immunkomplexen med substratet. De antigener som känns igen av de specifika antikropparna av typ IgG i proverna visas som lila tvärgående band.

REAGENSER SOM MEDFÖLJER KITET

Standard: paket med 24 tester (#TRI ES-WB24G).

kursivt: förpackning med 12 test (#TRI ES-WB12G) – **fetstil**: Förpackning med 96 tester (#TRI ES-WB96G).

ID	Mängd	Beskrivning	Sammansättning
R1	1	Mapp/mappar med 24 (12, 4x24) REMSOR: förklippta + färgade standardutförande. (Varje mapp och varje överföring identifieras med ett unikt serienummer)	Sensibiliserad nitrocellulosa. Färgad molekylärvikt (kDa): Blå: 250, blå: 150, blå: 100, rosa: 75, blå: 50, grön: 37, rosa: 25, blå: 20, blå: 15, gul: 10.
R2	1	Glasflaska med 30 (30, 125) ml PROVBUFFERT (klar för användning – rosa lösning).	Buffert + surfaktant.
R3	1	Glasflaska/-flaskor med 30 (30, 2x60) ml ANTI IgG-KONJUGAT (klar för användning – blå lösning).	Buffert + anti-humant IgG polyklonalt getserum konjugerat med alkalisk fosfatas + NaN ₃ (<0,1 %) + stabiliseringsmedel.
R5	1	Glasflaska med 30 (30, 125) ml SUBSTRAT (Klar för användning – ogenomskinlig brun glasflaska).	Buffert + NBT + BCIP + stabiliseringsmedel.
R6	1	Glasflaska med 60 (60, 250) ml av TVÄTTKONCENTRAT 10X BUFFERT (Ska spädas ut 10 gånger med destillerat vatten – färglös lösning).	Buffert + surfaktant.
R10	1	Provrör med 200 (200, 2x200) µl POSITIVT KONTROLLSERUM (Klar för användning – röd kork).	Buffert + pool med humanserum positivt i <i>Trichinella</i> serologi + NaN ₃ (<0,1 %) + stabiliseringsmedel.

R1: Bokstaven före varje bandnummer är specifik för parametern.

R2, R3, R5 och R6 är gemensamt för alla kit och har ett unikt lot-nummer, beroende på produktionsdatum. **Det rekommenderas att man utför tester med flera parametrar (se LDBIO immunoblotting-område) för att begränsa det antal glasflaskor som öppnas och för att säkerställa en bättre kvalitetskontroll.**

R10 är kalibrerad i immunblott enligt en referenslott och är endast avsedd för denna teknik.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

EUH 210 Säkerhetsdatablad finns att rekvirera och på vår webbplats www.ldbiodiagnostics.com.

YTTERLIGARE MATERIAL SOM KRÄVS MEN SOM INTE ÄR LEVERERAT

- Flerkanaliga inkubationsbrickor av polypropylen för mini-blotting (nr WBPP- 08 eller motsvarande).
- Vippbord för immunoblots, vakuumsystem för vätskor (provrör nr WBPP-08 som vi levererar kan tömmas genom att helt enkelt vända dem upp och ner).
- Provrör och material för att ta prover med, graderade cylindrar, anpassade behållare. Automatiska pipetter, mikropipetter och engångsspetsar (volymmer på 25 µl, 1,2 ml och 2 ml).
- Destillerat eller avjoniserat vatten. Absorberande papper (t.ex. Whatman filterpapper), genomskinlig tejp.
- Handskar, pincett för att hantera remsorna med, kniv eller skalpell, platt genomskinlig linjal.

Obs: Våra reagenser kan användas i automatiska system för immunoblotting. **Var noggrann så att eventuell kemisk kontaminering av våra reagenser inte sker om processorn delas med reagenser från andra tillverkare** (kända exempel: kontaminering av TWEEN 20), samt bakteriell kontaminering. Reservflaskor för bearbetningsapparaten. Kvarvarande reagenser ska inte placeras tillbaka i de ursprungliga flaskorna efter bearbetning.

FÖRVARING OCH STABILITET

Förvaras vid temperaturer mellan 2 och 8 °C. Använd inte förorenad eller grumligt reagens. Reagenserna från satsen är stabila fram till bäst före-datumet som anges på den utvändiga kartongen och på glasflaskornas etiketter. Tvättbuffert utspädd till 1/10 är stabil i 2 månader vid +2 till + 8 °C och en vecka vid rumstemperatur.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER VID ANVÄNDNING

Säkerhet

- Endast för användning *in vitro*. Endast för professionellt bruk. Endast för tekniskt utbildad personal. Hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och hantera alla reagenser och prover som om de vore potentiellt giftiga och/eller smittsamma.
- Använd labbrock, handskar och skyddsglasögon. Det är inte tillåtet att dricka, äta eller röka i labbet. Stoppa inte pipetterna i munnen.
- Positiv kontroll är ett serum av humant ursprung som har inaktiverats för HIV 1 och 2, hepatit B och hepatit C-virus. Det måste dock hanteras som en potentiellt smittsam produkt.
- Substratet innehåller en blandning av NBT och BCIP, giftigt vid kontakt (hud och slemhinnor) samt vid inhalering.
- Reagenserna innehåller natriumazid som kan skapa explosiva metalliska salter med bly och koppar. Skölj allt spill med vatten.
- Kassera allt avfall (prover, spetsar, rör, tvättvätskor, använd reagens, m.m.) i enlighet med de rutiner som används inom branschen samt enligt aktuella lagar i landet ifråga.
- Varje allvarlig incident måste vara föremål för en deklARATION till tillverkaren och den behöriga myndigheten.

Skyddsåtgärder

- Läs och tolka resultaten under direkt vitt ljus.
- Det är att föredra att använda alla reagenser från samma sats. Om olika tillverkningssatser används, se till att de kan spåras.
- Använd remsorna i nummerordning. Blanda inte remsor från olika lot nummer. Använd överföringar efter varandra. Etablera en specifik distributionsplan innan testet startas.
- Rör inte remsorna med fingrarna, använd pincett.
- Reagenserna måste blandas väl innan de används, speciellt den koncentrerade tvättbufferten.
- Stäng glasflaskorna efter bruk. Använd dem inte om en substans oavsiktligt fördes in i reagenserna. Använd inte en reagens från en glasflaska som uppvisar tecken på läckage. Använd inte grumliga eller lösningar eller lösningar med utfällningar.
- Använd endast pipettspetsar för engångsbruk. Undvik all förorening inom kanalen. Se upp om det bildas skum eller bubblor i pipettspetsarna (bakteriell förorening av reagensflaskor).
- Använd endast destillerat vatten för rengöring av brickor (använd aldrig rengöringsmedel eller blekmedel).
- Ett utelämnat prov eller en distribution av en otillräcklig volym kan leda till att testet blir falsk positiv eller falsk negativ.

INSAMLING AV PROV

Samla in prover aseptiskt i torra provrör. Det krävs minst 25 µl serum.

Förvara proverna vid 2–8 °C tills de ska analyseras. Om de behöver lagras mer än en vecka bör proverna frysas till -20 ± 5 °C. Använd inte provers som har förorenats. Undvik att frysa ned och tina upp proverna upprepade gånger.

Även om ingen särskild korsreaktion har observerats med hemolyserade, ikteriska eller lipidinnehållande serum så rekommenderas det att tolka resultaten från sådana prover med försiktighet.

FÖRBEREDELSE AV REAGENSER

Tvättbuffert: För 4 tester: använd en ren flaska och späd 10 ml tvättkoncentrat 10 gånger (R6) med 90 ml destillerat eller avjoniserat vatten. Var noga med att blanda den utspädda bufferten väl.

TESTPROCEDUR

Observera: Det rekommenderas att man utför tester med flera parametrar (se LDBIO immunoblotting-område) för att begränsa det antal glasflaskor som öppnas och för att säkerställa en bättre kvalitetskontroll.

1. Förbered en distributionsplan för proverna samt C+ positiv kontroll (**R10**).

Endast med hjälp av denna kontroll kan testet valideras tekniskt och identifieras för ett givet serienummer, av de specifika band som utvecklats. En C+-remsa kan inte användas för att tolka resultaten från remsor från en blott för ett annat serienummer.

2. Skär det antal remsor (R1) som krävs med en skalpell och en ren och torr, platt, genomskinlig linjal och behåll den blå positioneringslinjen på remsorna: håll remsorna på plats med linjalen och skär på den sida där du lägger tryck (numren är synliga genom linjalen).
3. Fördela 1,2 ml av provbuffert (R2) i varje kanal enligt den bestämda planen.
4. Lägg de numrerade remsorna i nummerordning i kanalerna: Låt remsorna rehydreras av sig själva på ytan i cirka 2 minuter, med numret synligt överst och skaka DÄREFTER försiktigt brickan så att de är helt nedsänkta i bufferten.
5. Distribuera proverna och positiva kontroller: enligt distributionsplanet med 25 µl per kanal. Skaka varje bricka försiktigt efter dispensering. Placera brickan på ett vippbord.
Inkubera 90 min ± 5 min vid 20-26 °C.
6. Tvättsteg: Töm innehållet i kanalerna med en Pasteur-pipett eller genom att vända på inkubationsbrickan. Fördela 2 till 3 ml utspädd tvättbuffert i var och en av kanalerna. Inkubera på vippbordet i 3 minuter. Upprepa 2 gånger och töm därefter ut innehållet i kanalerna. Se till att remsorna inte vänds under dessa steg.
7. Fördela 1,2 ml av anti-IgG-konjugatet (R3) i var och en av kanalerna. Placera brickan på ett vippbord.
Inkubera 60 min ± 5 min vid 20-26 °C
8. Tvättsteg: utför steg 6 igen.
9. Distribuera 1,2, ml av NBT/BCIP-substratet (R5) i var och en av kanalerna. Placera på ett vippbord och skydda från direkt ljus.
Inkubera 60 min ± 5 min vid 20-26 °C.

Övervaka framkallning av färgen oavsett parameter. Framkallningen kan stoppas om bakgrundsfärgen på remsan blir så mörk att det är svårt att göra avläsningar (kvaliteten av tvättstegen har en grundläggande påverkan på bakgrundsfärgen). Observera att remsorna blir ljusare när de torkar.

10. Stoppa reaktionen genom att aspirera substrat med en Pasteurpipett eller genom att vända på inkubationsröret och fördela 2 ml destillerat vatten i kanalerna. Utför de det tvättsteget en gång till.
11. Torka remsorna: Medan kanalerna fortfarande är vattenfyllda: lyft remsorna i den numrerade änden med en pincett och lägg dem på ett absorberande Whatman-papper, med numren synliga. Låt dem lufttorka. Färgen på remsorna blir ljusare medan de torkar. En tolkning får endast utföras efter att de har torkat fullständigt.
12. Förvaring: Lägg över remsorna på ett pappersark som kan användas för att arkivera dem. Rikta in positioneringslinjerna. Håll dem på plats med en platt linjal och fäst den översta delen av remsorna med genomskinlig tejp.

För att kunna göra en bra tolkning måste remsorna ordnas efter överföring och i nummerordning med några få millimeters mellanrum. Det är inte tillförlitligt att jämföra remsor som är placerade med för stort mellanrum (t.ex. nr 2 med nr 15). **Det är farligt** (falskt resultat) att jämföra remsor från olika satser (remsor med olika serienummer).

KVALITETSKONTROLL OCH TOLKNING

Serumkontrollen (R10) som följer med satsen måste ingå systematiskt i alla immunoblottingsserier. Den visar den typiska profilen och medger teknisk validering av väl utfört test (banden måste framgå mycket tydligt på remsan) och gör det möjligt att precist kalibrera de specifika bandens position och aspekt för att medge tolkning av resultaten för remsorna från samma överföring (samma serienummer).

Nota Bene: Den positiva kontrollprofilen (R10) kan variera beroende på hur mycket reagens som används. Motsvarande bilder finns som exempel på vår webbplats www.ldbiodiagnostics.com.

Beskrivning av banden

Ett positivt prov har band som visas mellan 37 och 140 kDa. Som rutin och för enkelhetens skull väljs endast det lågmolekylärviktade området (37 och 50 kDa) för avläsning.

3 band är systematiskt närvarande vid 37, 41 och 50 kDa. De kallas därför: **P37, P41 och P50**. Band P37 och P41 är mer intensiva. P50-bandet är oftast blekt.

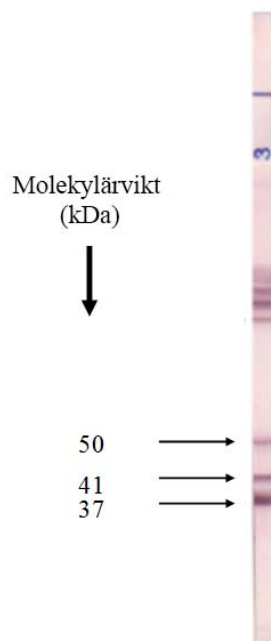


Fig. 1: Exempel på positiva resultat

Profilerna ges som exempel. Banden är märkta med bokstaven "F" som är specifik för parametern från partiet "05011".

Tolkning

Simultan närvaro av de tre banden **P37, P41 och P50** påvisar trichinellosis.

Vid validering av resultaten ska profilerna av immunoblottingen av proverna jämföras med resultatet av den positiva R10-kontrollen. Bandens aspekter är viktiga när testet tolkas.

BEGRÄNSNINGAR FÖR ANVÄNDNING

- En diagnos för en smittsam sjukdom kan inte ställas utifrån ett enda testresultat.
- Serologiska resultat måste tolkas utifrån tillgänglig information (t.ex. epidemiologisk, klinisk, bildbehandlingsbiologi, osv.) för att en diagnos ska kunna ställas. Za diagnozo se jih ne sme uporabljati samo na podlagi njihove pozitivnosti.

PRESTANDA (se litteraturreferenser)

Utvärderingen av **TRICHINELLA ES WB IgG**-satsens prestanda (*Trichinella spiralis ES* antigen) gjordes av ett oberoende laboratorie och jämförde den tidigare versionen av LDBIO Diagnostics sats (TRICHINELLA WB IgG - **total antigen** hädanefter benämnd: REFERENS-WB marknadsfört sedan 2001.

Sensitivitet (Se)

Det studerade provet motsvarar 80 serum från patienter som lider av klinisk trichinellosis.

Sensitivitet för referens-WB = **98,8 %**

Sensitivitet för **TRICHINELLA ES WB IgG** = **97,5 %**

Specificiteter (Sp)

Det testades på 165 serum från patienter som uppvisade närvaro av helminthiasis och som troligen skulle ha korsreaktioner: *Toxocara* (34), *Schistosoma* (34), filaria (5), echinococcosis (17) fasciolosis (2), strongyloidiasis (5), cysticercosis (27) samt andra autoimmuna sjukdomar: reumatoid faktor (9), Autau antikroppar (32).

Specificitet för referens-WB = **95,7 %**

Specificitet för **TRICHINELLA ES WB IgG** = **96,4 %**

Note: En systematisk studie av 500 prover från blodgivare avslöjade en prevalens på 2,4 % av positiva serologier med satsen **TRICHINELLA ES WB IgG**. Det är 6,4 % med referens-WB. Dessa resultat, som ofta är svagt intensiva men ändå överraskande, publicerades 2011 under den 13:e internationella kongressen om Trichinellosis (ICT). En förklaring saknas fortfarande.

Slutsats

Korrelationen mellan **TRICHINELLA ES WB IgG** och klinisk status är utmärkt.

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

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

Konfidensintervall beräknas enligt Wilsons metod med kontinuitetskorrigering.

Reproducerbarhet

Reproducerbarhet mellan serier och mellan lot nummer testades. I båda fallen var korrelation serum-till-serum med avseende på specifika band utmärkt.

Störningar

Även om ingen särskild korsreaktion har observerats med hemolyserade, ikteriska eller lipidinnehållande serum så rekommenderas det att tolka resultaten från sådana prover med försiktighet.

FELSÖKNING

"Banden är bleka med lite kontrast": Vissa serum med låg koncentration av antikroppar kan ge sådana resultat.

"Skuggade områden kan ses, mer eller mindre färgade, aningen diffusa": Remsan har inte sänkts ned fullständigt i ett av reagenserna och blev inte korrekt inkuberat längs hela dess längd. Det kan även förekomma fläckar där provet blev placerades om bricken inte skakades efter fördelning.

"Bakgrundsbrus är signifikant och gör en avläsning mycket svår": Tvättningarna var otillräckliga eller så var den senaste inkuberingen för lång. Se till att använda tekniker för god testprestanda, håll tvättiderna och säkerställ vattnets kvalitet. Sänk tiden för den sista inkuberingen.

Undantagsvis kan vissa serum reagera på ett ospecifikt sätt. Resultatet från immunoblottingen kan då inte

användas. Detta ickespecifika bakgrundsbrus kan omfatta bara en del av remsan vilket gör resultatet för den delen otolkbart.

”En fällning dyker upp i lösningen under det sista steget av utvecklingen”: substratet kan i verkligheten bilda en fällning (svarta flagor) i bufferten vid slutet av utvecklingen. Detta fenomen ändrar inte kvaliteten på utvecklingen, vilken måste fortsätta som normalt. Den sista tvätten med destillerat vatten tar bort eventuella fasta partiklar som kan finnas närvarande.

BIBLIOGRAFI

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

Uppdateringsmeddelande - läs noggrant

Släppdatum	Version	Andringsöversikt
12/08/2021	Vs 15	Borttagning av säkerhetsvarning R5 - E-postadress för kontaktperson – NaN3 EUH 032.
30/11/2022	Vs16	Ny adress
16/01/2023	Vs17	R6 utan NaN3. Remsan identifieras med bokstaven. Eventuell användning av reagenser från olika partier.



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