

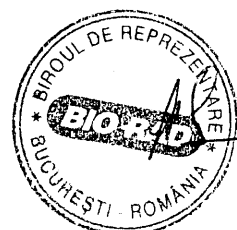
Trichin-L

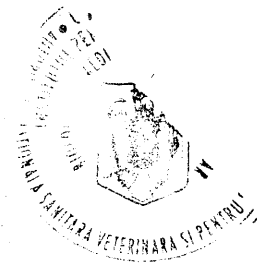
Trichinella Antigen test Kit

80 teste

Ref.: 357-2120

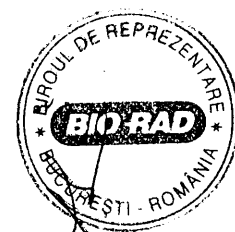
Kit pentru detectarea antigenelor *Trichinella* la
porcine





CUPRINS

| | |
|--|----|
| 1. INFORMAȚII GENERALE | 3 |
| 2. PRINCIPIUL METODEI | 3 |
| 3. DESCRIEREA COMPONENTELOR KITULUI | 4 |
| 4. PREPARAREA REACTIVILOR | 4 |
| 5. CONDIȚII DE DEPOZITARE ȘI MANIPULARE | 5 |
| 6. RECOLTAREA ȘI PREPARAREA PROBEI | 5 |
| 7. PROTOCOLUL METODEI | 5 |
| 8. INTERPRETAREA REZULTATELOR | 8 |
| 9. MATERIALE NECESARE DAR NEINCLUSE ÎN KIT | 9 |
| 10. PRECAUȚII | 9 |
| 11. INSTRUCȚIUNI DE SIGURANȚĂ ȘI IGIENĂ | 9 |
| 12. REFERINȚE | 10 |



1. INFORMAȚII GENERALE

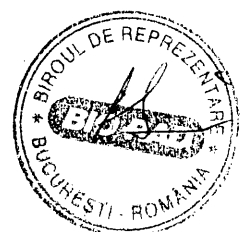
Trichineloză este o infecție cauzată de nematodul parazit *Trichinella*. Deși *Trichinella* poate fi găsită într-o mare varietate de animale din întreaga lume, carnea de porc este principala sursă de infecție la om, în țările dezvoltate.

Potrivit regulamentelor europene CE nr 2075/2005, metoda de aur standard pentru detectarea larvei în țesutul muscular infectat, se bazează pe digestie enzimatică și anume prelevarea de eșantioane colective urmate de metode de decantare și de un examen microscopic al larvelor.

Trichin-L, este o metodă alternativă nouă pentru digestia eșantioanelor colective, dezvoltată recent. Primii pași în testarea Trichin-L sunt similari cu cei descriși în metoda digestiei eșantioanelor colective. Aceasta diferă în ceea ce privește ambii pași de decantare, înlocuiți cu un pas de filtrare a larvelor de *Trichinella* - și un pas de detectare final, care constă într-un test de aglutinare latex. Acesta permite astfel verificarea prezenței sau absenței antigenelor *Trichinella*.

2. PRINCIPIUL METODEI

Sferele de latex sunt acoperite de o legătură covalentă de anticorpi monoclonali de soarece anti-*Trichinella*. Acest test permite detecția antigenelor *Trichinella*. Citirea testului se realizează foarte ușor, datorită utilizării de sfere în suspensie de latex albastru dispuse în cadrul unui perimetru incolor. În cazul unui test negativ, se obține o imagine uniformă albastră. În cazul unui test pozitiv, se observă o aglutinare de agregate colorate în albastru intens în cadrul perimetrului incolor.

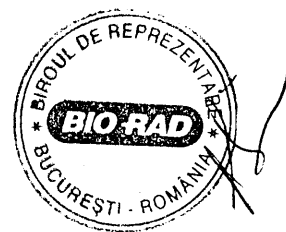


3. DESCRIEREA COMPONENTELOR KITULUI

| Identificare pe etichetă | Descriere | Cantitate |
|--------------------------|--|------------------------------|
| R1 | Carduri de aglutinare latex cu 8 spoturi de reacție fiecare | 10 Bucăți |
| R2 | Diluant probă: Soluție tampon cu conservant (< 1.5% Proclin™ 300) | 1 flacon (40ml) |
| R3 | Control negativ: soluție tampon cu albumină serică bovină (ASB) și conservant (<1,5% Proclin™ 300) | 1 flacon cu pipetă (0.75 ml) |
| R4 | Control pozitiv: Antigen de <i>T. spiralis</i> diluat în soluție tampon cu albumină serică bovină (ASB) și conservant | 1 flacon cu pipetă (0.75 ml) |
| R7 | Sfere de latex: soluție tampon ce conține particule de polistiren acoperite cu anticorpi monoclonali, albumină serică bovină (ASB) și conservant (<1,5% Proclin™ 300) | 1 flacon cu pipetă (2.5 ml) |
| | Pepsină: pepsină pulbere derivată din mucoasa gastrică de la porcine | 2 x 300 g |
| | Bețișoare de unică folosință | x 80 |
| | Membrane de filtrare | x 60 |
| | Lingură calibrată | x1 |
| | Foarfecă | x1 |

4. PREPARAREA REACTIVILOR

Toți reactivii din kitul *Trichin*-L sunt gata de utilizare.



5. CONDIȚII DE DEPOZITARE ȘI MANIPULARE

Toți reactivii sunt stabili până la data de expirare înscrisă pe etichetă, dacă sunt păstrați la 2-8°C, și în absența contaminării microbiene.
Depozitați reactivii în poziție verticală.

| Identificare | Reactiv | Perioadă de valabilitate |
|--------------|-------------------|--|
| R2 | Tampon de spălare | 1 lună după deschidere |
| R3 | Control negativ | 1 lună după deschidere, depozitat la 2 - 8°C |
| R4 | Control pozitiv | 1 lună după deschidere, depozitat la 2 - 8°C |
| R7 | Sfere de latex | 1 lună după deschidere, depozitat la 2 - 8°C |

REACTIVII LATEX NU TREBUIE ÎNGHEȚAȚI

6. RECOLTAREA ȘI PREPARAREA PROBEI

Pentru specia de porcine domestice, se recoltează o probă cântărind între 1 g și 1.15 g din pilonul diafragmei. Dacă proba este colectată din diafragmă, mușchiul maseter sau a limbii, este necesară o cantitate de 2 x 1 g. Pentru a colecta cantitatea necesară de probă poate fi folosit un instrument de colectare precum foarfeca.

Notă: înainte de testare, probele pot fi păstrate la +2°C + 8°C timp de 24 de ore sau congelate la -20°C imediat după prelevare.

Pentru scoafe și vierii reproducători, se recoltează o probă de cel puțin 2 X 1g, colectată din pilonul diafragmei. Dacă proba este colectată din diafragmă, mușchiul maseter sau a limbii, este necesară o cantitate de 4 x 1 g. Pentru a colecta cantitatea necesară de probă poate fi folosit un instrument de colectare precum foarfeca.

Notă: înainte de testare, probele pot fi păstrate la +2°C + 8°C timp de 24 de ore sau congelate la -20 ° C imediat după prelevare.

☞ *Bio-Rad recomandă să fie monitorizată periodic exactitatea greutății probelor eșantionului, pe o populație statistică reprezentativă de probe prelevate, astfel asigurându-se că ponderile eșantioanelor sunt în limite acceptabile.*

7. PROTOCOLUL METODEI (porcine domestice, până la 100 g de probe colective)

Protocolul testului *Trichin-L* este împărțit în 4 etape.

Toți reactivii trebuie să fie lăsați la temperatura camerei [18°C - 30°C], cel puțin 30 de minute înainte de utilizare.

TOCAREA CĂRNII / DIGESTIA ENZIMATICĂ

1) Pregătirea tamponului de digestie

Se adaugă succesiv următorii reactivi într-un pahar de 3 litri, amplasat pe o placă de încălzire:

- 2 litri de apă de la robinet preîncălzită la 46-48°C

- 16 ml de acid clorhidric 25% (0,2% final)



Cu o tijă agitatoare de sticlă agitați la viteză suficient de mare pentru a crea un vârtej central profund, fără stropire.

Se adaugă 10±1 g de pepsină (0,5% final). Lingura calibrată inclusă în kit poate fi utilizată pentru a distribui pepsina: o măsură plină este suficientă. Exactitatea greutății pepsinei trebuie să fie controlată în mod regulat.

Așteptați dizolvarea completă a pepsinei.

2) Tocarea cărnii

Se măsoară 150 ml de tampon digestie într-un pahar gradat. Se adaugă în vasul de blender:

- 100 - 115 g de eșantion de carne prelevat în conformitate cu capitolul 6.
- 150 ml de tampon de digestie din paharul gradat.

Notă: În caz de eșantioane mai mici (de exemplu, 50 x 1 g) trebuie să se respecte întotdeauna raportul cantitatea de carne și tamponul de digestie. Cantitatea minimă de probă este de 50 g per eșantion de carne.

Se introduce carnea în blender pentru **20 de secunde la 18000 rpm** (doar 10 secunde pentru probele tocate utilizate în testele experimentale).

3) Digestia enzimatică

Păstrați 500 ml de tampon digestie într-un pahar Berzelius.

Se adaugă aproximativ 500 ml de tampon de digestie din vas în blender.

Apoi, se toarnă omogenatul din probă (~ 750 ml) în vasul tampon care conține restul de tampon de digestie din bolul mixerului.

Clătiți cu grijă bolul mixerului și capacul acestuia cu 500 ml tampon de digestie din paharul Berzelius apoi turnați lichidul în paharul Berzelius folosit pentru incubare. Se incubează timp de **30 minute la 44-46°C, cu agitare** cu o viteză suficient de mare pentru a crea un vârtej central profund, fără stropire. Puneți o folie de aluminiu deasupra paharului Berzelius.

Notă: Atunci când se recoltează probă din limba este necesar un timp de incubare de 45 minute.

FILTRAREA

4) Configurarea unității de filtrare

Poziționați în următoarea ordine componentele unității de filtrare:

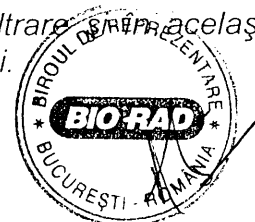
- O membrană de filtrare pe suport
- Pâlnia de filtrare conică (fixată la suport cu sistem de blocare)
- O sită din oțel inoxidabil (180 microni - dimensiunea ochiurilor de plasă)

Înainte de filtrare porniți pompa de vid câteva secunde.

5) Filtrarea

Se oprește agitatorul și se toarnă amestecul omogen de proba digerată în pâlnia de filtrare prin sită.

Notă: Filtrarea volumului complet durează, de obicei mai puțin de 5 minute. Probele incorect digerate au nevoie de mai mult de 5 minute pentru filtrare. Dacă același timp acestea pot fi interpretate mai greu, la sfârșitul protocolului testului.



Se clătește paharul cu cel puțin 250 ml de apă caldă (18°C - 45°C). Apa trebuie să fie turnată în pâlnia de filtrare după ce amestecul omogen de probă digerată a fost filtrat cu succes (cu apa caldă se va clăti sita și se elimină urmele reziduale de aciditate).

Tocarea probei și digestia enzimatică sunt eficiente în cazul în care, după filtrare, pe suprafața sitei rămân mai puțin de 5 g de carne.

Cu ajutorul forcepsului (inclus în kit), se ia membrana de filtrare, ținându-se de o margine. Se pliază în patru și se introduce într-un tub Falcon® de 15 ml.

Notă: în acest stadiu, membrana de filtrare poate fi depozitată timp de 3 ore, la temperatura camerei [+18°C până la +30°C] sau la [+2°C până la +8°C].

☛ *Toate materialele care intră în contact cu proba (blender, castron, pahar, tija de agitare, senzor de temperatură, pâlnie de filtrare conic, sită și forcepsul) trebuie să fie decontaminate cu apă caldă (63°C la 90°C). Reziduurile din carne sau larve inactivate, care ar putea rămâne pe suprafața lor, pot fi eliminate cu un burete de curățat și apă de la robinet.*

*Dacă este necesar, pot fi adăugate câteva picături de detergent pentru degresarea echipamentelor. **Este recomandat să clățiți bine fiecare componentă pentru a îndepărta toate urmele de detergent.***

SOLUBILIZAREA ANTIGENULUI

Dacă utilizați un pistil manual, este necesară urmărirea pașilor 6) și 7) de solubilizare a antigenului.

Dacă utilizați pistilul automatizat, pur și simplu adăugați 0,5 ml de diluant de probă (R2) în tubul Falcon® de 15 ml și urmați instrucțiunile pistilului automat.

6) Strivirea membranei de filtrare

Împingeți membrana de filtrare până în partea de jos a tubului Falcon®, cu ajutorul pistilului și striviți puternic cu 20 de lovituri succesive cu pistilul.

Notă: Pistilul trebuie să fie poziționat în interiorul pliului membranei de filtrare pentru a asigura o strivire optimă a larvei.

7) Solubilizarea Antigenului

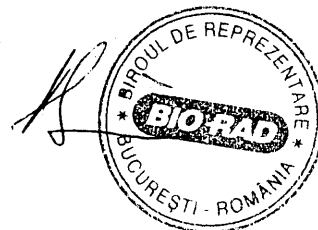
Adăugați 0,5 ml de diluant pentru probă (R2) în tubul Falcon® de 15 ml și omogenizați antigenele cu ajutorul pistilului prin mișcări de rotație de amplitudine mică timp de 30 de secunde. Evitați mișcările bruște pentru a limita stropirea cu lichid.

☛ *Pistilul trebuie să fie decontaminat cu atenție în serii de înmuiere pentru câteva secunde, în cel puțin 250 ml de apă caldă (63°C - 90°C). Eliminați reziduurile de carne sau de antigene care ar putea rămâne pe suprafață, cu un burete curat și apă de la robinet.*

*Dacă este necesar, pot fi adăugate câteva picături de detergent în vederea degresării echipamentului. **Este recomandat să clățiți bine fiecare bucată pentru a îndepărta toate urmele de detergent.***

Apă caldă utilizată pentru înmuiere trebuie să fie schimbată la fiecare 6 serii.

Notă: În acest stadiu, proba poate fi depozitată timp de 24 de ore la +2°C până la 8°C.



DETECTIA

8) Distribuirea probelor și a controalelor

Se pipetează 50 μl de probă sau 50 μl (2 picături) de control negativ (R3) sau 50 μl (2 picături) de control pozitiv (R4), într-un spot pe suprafața cardului de aglutinare.

9) Distribuirea conjugatului

Notă: Înainte de utilizare, sferele de latex (R7) trebuie să fie omogenizate cu prudență (minim 10 răsturnări de tub), până când soluția devine omogenă.

Se adaugă **25 μl (1 picătură) sfere de latex (R7)**, fără atingere, peste prima picătură de probă /control.

În fiecare spot, se amestecă ușor cu un bețișor de unică folosință, până când lichidul omogen acoperă toată suprafața spotului.

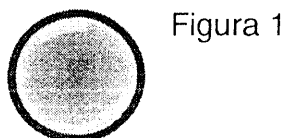
Puneți cardul de aglutinare pe suprafața agitatorului orbital 3D și porniți-l timp de **10 minute la viteza maximă (~ 30 rpm)**.

10) Citirea cardului

Opriți agitatorul orbital. Puneți cardul de aglutinare pe o suprafață plană. Pentru o citire optimă operatorul trebuie să fie poziționat la aproximativ 40 de centimetri de cardul de aglutinare. Un eșantion este pozitiv în cazul în care aglutinarea a apărut în timpul celor 10 minute de agitare.

8. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Reacție negativă: suspensia de soluție de pe suprafața spotului rămâne albastră și omogenă (figura 1). Comparați cu controlul negativ.



Reacție pozitivă: se observă formarea sferelor de aglutinare. (mai mult sau mai puțin intensă - a se vedea figurile 2, 3 și 4). Proba conține antigene de *Trichinella*.



Figura 2



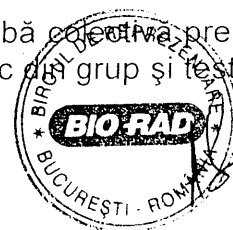
Figura 3



Figura 4

Atunci când un eșantion colectiv are un rezultat pozitiv, se recoltează 20 g de probă (20 x 1 g) de la fiecare porc, în conformitate cu capitolul 7. Cele 20g de probe sunt examinate utilizând metoda descrisă mai sus. În acest fel pot fi examinate probe de la 20 de grupuri de câte 5 porci.

În cazul în care antigenele *Trichinella* sunt detectate într-o probă colectivă prelevată de la 5 porci, se vor recolta 20 g per probă (20x1g) de la fiecare porc din grup și testate separat



utilizând metoda de mai sus.

9. MATERIALE NECESARE DAR NEINCLUSE ÎN KIT

Prelevarea probei

- foarfecă pentru prelevarea probelor de carne
- balanță analitică

Măcinarea probei

- blender de laborator cu vas de sticlă 1.25 L (Cat. # 359-3980)
- cronometru

Digestia probei

- agitator magnetic cu plită electrică cu termostat și sondă externă (Cat. # 359-3981)
- baghete de agitare acoperite cu teflon
- pahar Berzelius 3 L
- pahar Berzelius 500 ml
- pipetă 10 ml sau eprubetă de 20 ml
- acid clorhidric concentrat
- cronometru

Filtrarea probei

- Sistem de filtrare de bază unică (Cat. # 359 -3979), pâlnie de oțel de 500 ml (Cat. # 359 - 3987), furtun de cauciuc roșu cu perete gros (Cat. # 359 - 3988), sită de 180 μm (Cat. # 359 - 3989)
- Pompă de vacum IP-20T (Cat. # 359-3985)
- Capace 83B, 2 porturi de 1/4" (Cat. # 359-3984)
- Recipient de plastic 10 L (Cat. # 359-3983)
- Foarfecă
- Tuburi de testare de 500ml

Solubilizarea antigenului

- Tuburi Falcon[®] de 15 ml (Cat. # 357-2123)
- Pistil manual (Cat. # 359-3986) sau automat (Cat. # 359-3997)
- Pipetă 0.5 ml

Detectia antigenului

- Pipetă 50 μl
- Agitator orbital 3D (Cat. # 359-3982)
- Cronometru

10. PRECAUȚII

Calitatea rezultatelor depinde de respectarea bunelor practici de laborator:

- Nu utilizați reactivii după expirarea lor.
- Toți reactivii ar trebui să fie folosiți la temperatura camerei (18-30°C).
- Nu amestecați sau asociați reactivi din kituri cu numere de lot diferite
- Nu atingeți spoturile cardurilor de aglutinare cu degetele.
- Schimbați vârful pipetei sau vârful sondei de prelevare pentru fiecare probă testată.
- Agitați flaconul cu sfere de latex, înainte de utilizare.
- Schimbați bețișorul pentru fiecare reacție.
- Aruncați toate materialele de unică folosință utilizate într-un coș de gunoi autoclavabil sau într-o baie de dezinfectare

11. INSTRUCȚIUNI DE SIGURANȚĂ ȘI IGIENĂ

În general, condițiile de igienă, măsuri de biosecuritate și a bunelor practici de laborator trebuie să fie în acord cu recomandarea de autoritățile de reglementare ale țării.

- Toți reactivii din kit sunt destinați utilizării în testarea "in vitro".



- Toate materialele care intră în contact direct cu probe și soluții trebuie să fie considerate ca fiind contaminate.
 - Evitați stropirea cu probe sau soluții care conțin probe.
- Conform legislației europene, kiturile ce conțin ProClin™ 300 (<1,5%) și pepsina (100%), sunt clasificate ca fiind periculoase.



Xn-Periculos

R43: Poate cauza sensibilizare prin contact cu pielea.

R36/37/38-42: Iritant pentru ochi, sistemul respirator și piele. Poate provoca sensibilizare prin inhalare.

12. REFERINȚE

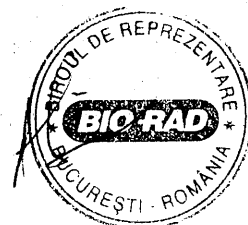
Regulamentul Comisiei Europene (CE) nr 2075/2005. Reguli specifice privind controalele oficiale pentru *Trichinella* în carne. JO L 338, 22.12.2005, p. 60.

Appleton JA, Bell RG., Homan W. și Van Knapen F. (2001). Consens cu privire la antigenele și anticorpilor de *Trichinella spiralis* Vet. Parasitol, 39., 75-84.

Pozio E. (2007). Distribuirea la nivel global a infecțiilor cu *Trichinella spp.* la animale și la om. Vet. Parasitol, 149., 3-21.

P. Rossi și Pozio E. (2008). Linii directoare pentru detectarea larvelor de *Trichinella* la abator în sistemul de asigurare a calității. Ann. Ist. Super. Sanita, 44 (2), 195-199.

Boireau P., Vayssier M., Fabien JF, Perret C, Calamel & M. Soule C. (1997). Caracterizarea a unsprezece grupuri antigenice din genul *Trichinella* și identificarea de etape și a markerilor de specii. Parazitologie, 115, 641-651



B(04/12)

Trichin-L (357-2120)

Trichin-L

Trichinella Antigen Test Kit

REF 357-2120

LOT 1A0003



2011-11-30

R1 [Lot] 0M0003

R7 [Lot] 0M0003

R2 [Lot] 0M0003

Pepsin [Lot] 0L0003

R3 [Lot] 0M0003

Filters [Lot] 110125008

R4 [Lot] 0M0003



P72120IT1A0003

Trichin-L

REF 357-2120

Trusă de testare a antigenului *Trichinella*

LOT 1A0003



2011-11-30

R1 [Lot] 0M0003

R7 [Lot] 0M0003

R2 [Lot] 0M0003

Pepsina [Lot] 0L0003

R3 [Lot] 0M0003

Filtre [Lot] 110125008

R4 [Lot] 0M0003



P72120IT1A0003



II – Etichete ce apar pe ambalajele reactivilor

ROMANIA
INSTITUTUL NATIONAL DE SANITATE PUBLICA
BUCURESTI

Trichin-L

Latex agglutination cards 10

Form *in vitro* Test 72104

LOT 4K9124

2310-06-17

R1

BIO-RAD Bio-Rad - F-92430 Marnes-lez-Liège

Trichin-L

Carduri latex pentru aglutinare 10

Form *in vitro* Test 72104

LOT 4K9124

2310-06-17

R1

BIO-RAD Bio-Rad - F-92430 Marnes-lez-Liège

Trichin-L

Sample diluent 40 ml

Form *in vitro* Test 7230B

+8°C

+2°C

R2

X

LOT 4K9124

2310-06-17

Bio-Rad
F-92430 Marnes-lez-Liège

BIO-RAD



Trichin-L

| | |
|---------------------------------|-------|
| Diluant pentru proba | 40 ml |
| Pentru testarea <i>in vitro</i> | 7220B |

+2°C +8°C

R2

X

En-Fas
F 92450 Mamele albe

Trichin-L **R3**

| | |
|---------------------------------|---------|
| Negative control | 0.75 ml |
| Pentru testarea <i>in vitro</i> | 7220C |

+2°C +8°C

X

En-Fas
F 92450 Mamele albe

Trichin-L **R3**

| | |
|---------------------------------|---------|
| Control negativ | 0.75 ml |
| Pentru testarea <i>in vitro</i> | 7220C |

+2°C +8°C

X

En-Fas
F 92450 Mamele albe

Trichin-L **R4**

| | |
|---------------------------------|---------|
| Positive control | 0.75 ml |
| Pentru testarea <i>in vitro</i> | 7220D |

+2°C +8°C

X

En-Fas
F 92450 Mamele albe

Trichin-L **R4**

| | |
|---------------------------------|---------|
| Control pozitiv | 0.75 ml |
| Pentru testarea <i>in vitro</i> | 7220D |

+2°C +8°C

X

En-Fas
F 92450 Mamele albe

