

TOXOCARA CANIS

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de toxocaríase humana

96 ensaios em poços individuais

Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9200
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01755



Utilização prevista:

Diagnóstico serológico (IgG) de toxocaríase humana (síndrome *larva migrans* visceral ou ocular).

Confirmação de casos clínicos suspeitos e pesquisas sero-epidemiológicas.

Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em poços de microplaca sensibilizados com antígenos larvares excretados/segregados de *Toxocara canis*. A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

Material incluído no kit (96 ensaios):

WELL	9200-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com antígenos E/S de <i>Toxocara canis</i>	96	poços
DILB	9200-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x)	50	ml
WASH	9200-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
ENZB	9200-04	Tampão da enzima	50	ml
STOP	9200-05	Solução de paragem (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9200-06	Soro de controlo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9200-07	Soro fracamente positivo (cut off)	200	µl
CONTROL +	9200-08	Soro de controlo positivo	200	µl
CONJ	9200-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina	300	µl
SUBS	9200-10	Substrato de fosfatase	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e μ l). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

Preparação de reagentes antes da sua utilização:

Poços ELISA: abrir a parte lateral do saco de alumínio 9200-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

Tampão de diluição: diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9200-02, 1/10 em água destilada.

Solução de lavagem: diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9200-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

Soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10 μ l de soros de controlo 9200-06 a -08 em 190 μ l de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

Soros a testar: diluir 10 μ l de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 9200-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

Solução de substrato: pré aquecer o tampão da enzima 9200-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9200-10 em tampão não diluído 9200-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

Solução de paragem: utilizar reagente 9200-05 não diluído.



Advertências e precauções: as soluções 9200-02, 9200-03, 9200-04 e 9200-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio (NaN_3). A solução 9200-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 9200-05 (0,5 M K_3PO_4) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9200-06 a -08) são de coelhos.

Volumes a preparar:

			Quantidade total de poços a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampão de diluição (10 x)	9200-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Solução de lavagem (10 x)	9200-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9200-09 + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Soros de controlo	9200-06 a -08 + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Soros a testar	Soro + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solução de substrato	9200-10 + 9200-04	past. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedimento:

Passo 1: bloqueio:

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

Passo 2: incubação com amostras séricas:

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 3: incubação com conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 4: incubação com substrato:

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

Passo 5: medição das absorvâncias:

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 8 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9200-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de toxocaríase e soros humanos saudáveis.

O resultado é **negativo** quando a absorvância da amostra analisada é inferior à absorvância do soro fracamente positivo 9200-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos E/S de *Toxocara* é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando a absorvância da amostra analisada é superior à absorvância do soro fracamente positivo 9200-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos E/S de *Toxocara* é considerada clinicamente significativa.

Sensibilidade e especificidade do ensaio:

A sensibilidade de diagnóstico do teste é de 91%. A especificidade da reação em relação a outras infeções parasitárias é de 86%. Ocorre reatividade cruzada maioritariamente em doentes com Trichinellosis, fasciolíase, amebíase e estrogiloidíase. Foi detetada uma especificidade de 96% com 500 soros de dadores de sangue (suíços). Foi publicada uma avaliação detalhada do kit por Jacquier *et al.* (1991). A avaliação interna realizada mostrou que soros hemolisados, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio. A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média (absorvância)	1,067	2,383	0,960	2,152
Desvio padrão (absorvância)	0,043	0,110	0,038	0,063
Coefficiente de variação (%)	4,0	4,6	4,0	2,9

Referências:

De Savigny, D.H., Voller, A. and Woodruff, A.W. (1979) Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Path.* **32** : 284-288.

Speiser, F. and Gottstein, B. (1984) A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Tropica.* **41**: 361-372.

Jacquier, P., Gottstein, B., Singelin, Y. and Eckert, J. (1991) Immunodiagnosis of Toxocarosis in Humans: Evaluation of a New Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1831-1835.

Choi, D., Lim, J.H., Choi, D-C., Paik, S.W., Kim, S-H. and Huh, S. (2008) Toxocariasis and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. *Korean J. Parasitol.* **46**, 139-143.

Jin, Y., Shen, C., Huh, S., Sohn, W-M., Choi, M-H. and Hong, S-T. (2013) Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA Using Crude Antigen of *Toxocara canis* Larvae. *Korean J. Parasitol.* **51**, 433-439.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Tel.: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

