

# TOXOCARA CANIS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus toksokarozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9200

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755

## Naudojimo paskirtis:

Serologinei žmogaus toksokarozės (vidaus organų arba akių) diagnozei (IgG). Įtariamų klinikinių atvejų patvirtinimui ir seroepidemiologiniams tyrimams.

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Toxocara canis* E/S antigenais, atlikimui. Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

|                    |         |  |     |            |
|--------------------|---------|--|-----|------------|
| <b>WELL</b>        | 9200-01 | Laužomos ELISA juostelės su <i>Toxocara canis</i> E/S antigenais | 96  | šulinėliai |
| <b>DILB</b>        | 9200-02 | Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)                            | 50  | ml         |
| <b>WASH</b>        | 9200-03 | Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)                            | 50  | ml         |
| <b>ENZB</b>        | 9200-04 | Fermento buferis   | 50  | ml         |
| <b>STOP</b>        | 9200-05 | Stabdomasis tirpalas (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )           | 25  | ml         |
| <b>CONTROL</b> -   | 9200-06 | Neigiamas kontrolinis serumas                                    | 200 | μl         |
| <b>CONTROL</b> -/+ | 9200-07 | Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)                      | 200 | μl         |
| <b>CONTROL</b> +   | 9200-08 | Teigiamas kontrolinis serumas                                    | 200 | μl         |
| <b>CONJ</b>        | 9200-09 | Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas                       | 300 | μl         |
| <b>SUBS</b>        | 9200-10 | Fosfatazės substratas  | 20  | tablečių   |
|                    |         | Multipipetės rezervuaras, 25 ml                                  | 1   | vienetas   |
|                    |         | Rémelis – ELISA 8-šulinėlių laikikliams                          | 1   | vienetas   |

## Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°- 8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

## Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

## Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

**ELISA šulinėliai:** atidaryti folinio maišelio 9200-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

**Skiedimo buferis:** praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9200-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

**Plovimo tirpalas:** praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9200-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9200-06 – 9200-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

**Tiriamas serumas:** praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 9200-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

**Substrato tirpalas:** atšildyti fermento buferį 9200-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9200-10 nepraskiestame buferyje 9200-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

**Stabdomasis tirpalas:** reagentą 9200-05 naudoti neskietą.



**Įspėjimai ir atsargumo priemonės:** Tirpalai 9200-02, 9200-03, 9200-04 ir 9200-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido ( $N_3Na$ ). Tirpalas 9200-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9200-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9200-06 – 9200-08) yra iš triušių.

## Reikalingi tūriai:

|                                |                                   |            | Naudojamų šulinėlių skaičius |           |           |           |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                |                                   |            | 3-4                          | 5-6       | 7-8       | 9-10      |
| <b>Skiedimo buferis (10 x)</b> | 9200-02 + H <sub>2</sub> O        | ml + ml    | 1 + 9                        | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Plovimo tirpalas (10 x)</b> | 9200-03 + H <sub>2</sub> O        | ml + ml    | 1 + 9                        | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Konjugatas</b>              | 9200-09 + skiedimo buferis        | µl + µl    | 10 + 500                     | 15 + 750  | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| <b>Kontrolinis serumas</b>     | 9200-06 to -08 + skiedimo buferis | µl + µl    | 10 + 190                     | 10 + 190  | 10 + 190  | 10 + 190  |
| <b>Tiriamas serumas</b>        | Serumas + skiedimo buferis        | µl + µl    | 10 + 2000                    | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| <b>Substrato tirpalas</b>      | 9200-10 + 9200-04                 | tabl. + ml | 1 + 2.5                      | 1 + 2.5   | 1 + 2.5   | 1 + 2.5   |

## Procedūra:

### 1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

### 2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės šulinėlį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 µl kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 µl).

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

### 3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

### 4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

### 5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

## Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9200-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo toksokarozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9200-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš **Toxocara canis** E/S antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9200-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš **Toxocara canis** E/S antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

## Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

Testo diagnostinis jautrumas yra 91 %. Reakcijos specifiškumas, atsižvelgiant į kitas parazitines infekcijas, yra 86%. Kryžminis reaktyvumas gali įvykti pacientams su trichinelioze, faskioliaze, amebiaze ir strongiloidoze. 96% specifiškumas nustatytas, testuojant 500 kraujo donorų serumų (šveicarų). Detali rinkinio analizė publikuota Jacquier *et al.* (1991). Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius 24 šulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

|   | Atsikartojamumas |           | Atkuriamumas |           |
|---|------------------|-----------|--------------|-----------|
|   | Mėginys 1        | Mėginys 2 | Mėginys 1    | Mėginys 2 |
| <b>Vidurkis (absorbcija)</b>                | 1.067            | 2.383     | 0.960        | 2.152     |
| <b>Standartinis nuokrypis (absorbcijos)</b> | 0.043            | 0.110     | 0.038        | 0.063     |
| <b>Pokyčio koeficientas (%)</b>             | 4.0              | 4.6       | 4.0          | 2.9       |

## Literatūros šaltiniai:

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.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

