

# 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
Skiedimo buferis (10 x)	9200-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Plovimo tirpalas (10 x)	9200-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugatas	9200-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolinis serumas	9200-06 to -08 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Tiriamas serumas	Serumas + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrato tirpalas	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

