

Toxocara canis IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus toksokariozei nustatyti

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui



Naudojimo instrukcija produktui N° 9200
UDI-DI: 07640158219201



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Toxocara canis* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kokybiniam IgG antikūnų prie *Toxocara canis* žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

Kilmė:

Toksokariozė yra pasaulyje paplitusi zoonozė, kurią sukelia *Toxocara canis*, parazitinis unų nematodas, arba kačių *T. mystax*. ūmonės gali užsikrėsti atsitiktinai nuriję *Toxocara* embrionuotus kiaušinėlius. ūarnyne, i kiaušinėlių i sivyščiusios *Toxocara* lervos plačiai migruoja i audinius (kepenis, plaučius, raumenis, smegenis ar akis). Daugumai užsikrėtusių ūmonių nepasireiškia jokie simptomai. Tačiau, kai kuriais atvejais, migruojančios lervos gali sukelti „Visceral Larva Migrants“ (VLM) arba „Ocular Larva Migrants“ (OLM) sindromus. Diagnozė nustatoma remiantis VLM (eozinofilija, karščiavimas, kosulys, pilvo skausmas, hepatomegalija ir bėrimas) požymiais arba OLM (akuliariniai sutrikimai), bei poveikio istorija ir teigiamais serologinio tyrimo rezultatais.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) laūomuose mikrotitravimo ūulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Toxocara canis* išskiriamais/sekretuojamais (E/S) lerviniais antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie ūų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridedant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Toxocara canis* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridedamas reakcijos sustabdymui. Absorbcija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas yra rankinis, tačiau jį galima atlikti ir automatinės sistemos, kurias turi patvirtinti naudotojas.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9200-01	Lauūomos ELISA juostelės su <i>Toxocara canis</i> E/S antigenais	96	ulinėliai
DILB	9200-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9200-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9200-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9200-05	Stabdomasis tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9200-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), ūžalias dangtelis	200	ūūl
CONTROL -/+	9200-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	ūūl
CONTROL +	9200-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	ūūl
CONJ	9200-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	ūūl
SUBS	9200-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- ūūlinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti nuo +2°C iki +8°C (transportas patvirtintas nuo -20°C iki +37°C 21 dieną), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėūutės ūono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant nuo +2°C iki +8°C.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir ūūl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (+37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių skalavimo įranga. Sūūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio mai elio 9200-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruo tus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į dėmelį teisinga kryptimi. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9200-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

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 fosfatázės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9200-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, nuo +2°C iki +8°C.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 9200-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatázės substrato tabletę(es) 9200-10 neskiestame fermento buferyje 9200-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės viesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9200-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti mogaus serumą. Laikykite tarp +2°C iki +8°C, jei analizuojamaper 7 dienas, kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neu užaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml). Negalima laikyti praskiestus mėginius.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₃ N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9200-02	0,1%	0,02%
Plovimo tirpalas (10 x)	9200-03	0,05%	/
Fermento buferis	9200-04	0,01%	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9200-06 iki -08	0,1%	0,02%
Konjugatas (50 x)	9200-09	0,1%	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

Komponentas	Pavojingas komponentas	Pavojaus piktograma	Pavojaus pareiškimas	Atsargumo pareiškimas
Stabdomasis tirpalas	tribazinis kalio fosfatas	 	Smarkiai pažeidžia akis.	Naudoti akių apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: Atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9200-06 iki -08) yra gyvūnų kilmės (triušiai) ir turi būti tvarkomi atsargiai.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nema i yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitalioti dangtelių, kad būtų i vengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje www.bordier.ch.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Prieš inkubaciją:

Užpildykite duobutes 250 µl skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje.

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (mėginį be serumo).

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

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

Paalinti serumą į praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

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

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

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

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

5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdymo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę išvisų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 32% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 6% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 0,350

Jei mėginio skleidžiamas signalas viršija mikroplokštelių skaitytuvo matavimo diapazoną, turėtų būti priskirta vertė, atitinkanti viršutinį skaitytuvo matavimo diapazoną.

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: www.bordier.ch.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9200-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo toksokariazės ir sveiko, mogaus serumų. Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Toxocara canis** antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis arba lygus **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Toxocara canis** antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitu.

Kiekvienoje laboratorijoje gali būti apibrėžta pilkoji zona priklausomai nuo pacientų populiacijos. Jei rezultatai yra tarpiniai ar keliantys abejonių, rekomenduojame pakartotinai atlikti testą po 2-4 savaičių su nauju mėginiu.

Jei rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

Analitiniai pasirodymai:

Analitinis specifiškumas:

86% specifiškumas nustatytas 199 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems trichinelioze, fasciolioze, amebiaze ir strongiloidoze. Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu.

Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius dubliuojami 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
Vidurkis (absorbcija)	1,067	2,383	0,960	2,152
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0,043	0,110	0.042	0.093
Pokyčio koeficientas (%)	4,0	4,6	4.3	4.3

Klinikiniai pasirodymai:

Diagnostinis jautrumas:

91% jautrumas buvo nustatytas 78 pacientų, kuriems kliniškai įtariama toksokarozė, serumuose.

Diagnostikos specifiškumas:

500 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 96% specifiškumas. 98% specifiškumas buvo nustatytas 500 Šveicarijos gydymo įstaigose gydomų vaikų serumų (ne dėl toksokarozės).

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 72% PPV ir 99% NPV.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 99 Šveicarijos kraujo donorai ir 100 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,16. Paveiktoje populiacijoje, kurioje yra 20 teigiamų serumų, atlikus kitą anti-*Toxocara canis* IgG aptikimo testą, numatoma Indekso vertė yra 1,44.

Incidentai:

Apie bet kokią rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

Apribojimai:

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

Literatūros šaltiniai:

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.

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

Kim, H.B., Seo, J.W., Lee, J.H., Choi, B.S. and Park, S.G. (2017) Evaluation of the prevalence and clinical impact of toxocarosis in patients with eosinophilia of unknown origin. Korean J. Intern. Med. **32**, 523-529.

Overbosch, F.W., van Gool, T., Matser, A. and Sonder, G.J.B. (2018) Low incidence of helminth infections (schistosomiasis, strongyloidiasis, filariasis, toxocarosis) among Dutch long-term travelers: A prospective study, 2008-2011. PLoS ONE **13**.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.
📍 Chemin de Chatanerie 2, 1023 Crissier, Switzerland.
☎ +41 21 633 31 67 ✉ cb@bordier.ch 🌐 www.bordier.ch

