

TOXOCARA CANIS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human toxocariasis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9200
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af human toxocariasis (visceral eller ocular larva migrans syndrom).

Bekræftelse af mistænkte kliniske tilfælde og seroepidemiologiske studier.

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Toxocara canis*, udsøndrede/sekretoriske (E/S) larve-antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9200-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Toxocara canis</i> E/S antigener	96	brønde
DILB	9200-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9200-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9200-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9200-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9200-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	9200-07	Svagt positivt serum	200	µl
CONTROL +	9200-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	9200-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	9200-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9200-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9200-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9200-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μ l kontrolsera 9200-06 til -08 i 190 μ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9200-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 9200-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9200-10 i ufortyndet buffer 9200-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 9200-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 9200-02, 9200-03, 9200-04 og 9200-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (N_aN_3). Løsning 9200-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9200-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9200-06 til -08) er fra kaniner.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9200-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9200-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9200-09 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9200-06 til -08 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9200-10 + 9200-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 8 % af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9200-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af toxocarosis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9200-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Toxocara canis** E/S antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af det svagt positive serum 9200-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Toxocara canis** E/S antigener at være klinisk signifikant.

Analysens sensitivitet og specificitet:

Den diagnostiske sensitivitet af testen er 91%. Reaktionens specificitet med hensyn til andre parasitinfektioner er 86%. Krydsreaktivitet fremtræder primært hos patienter med trikinos, fascioliasis, amøbeinfektion og strongyloidosis. En specificitet på 96% blev fundet med 500 sera fra bloddonorer (schweiziske). En detaljeret evaluering af kittet er publiceret af Jacquier *et al.* (1991). Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	1,067	2,383	0,960	2,152
Standardafvigelse (absorbans)	0,043	0,110	0,038	0,063
Variationskoefficient (%)	4,0	4,6	4,0	2,9

Referencer:

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

