

TOXOCARA CANIS

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga toxocarosis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9200

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01755



Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) hos mänskliga toxocarosis (visceral eller okulär larva migrans (OLM))

Bekräftelse av misstänkta kliniska fall och seroepidemiologiska studier.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med **Toxocara canis**, utsöndrade E/Slarv antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 provningar):

WELL	9200-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med Toxocara canis E/S antigener	96	brunnar
DILB	9200-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9200-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9200-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9200-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9200-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9200-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9200-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9200-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9200-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kiten anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μl). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37°C . ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9200-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9200-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9200-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μl kontroll sera 9200-06 till -08 i 190 μl utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μl serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9200-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9200-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9200-10 i utspädd buffert. 9200-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9200-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9200-02, 9200-03, 9200-04 och 9200-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9200-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9200-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9200-06 till -08) är från kaniner.

Volymmer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9200-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9200-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9200-09 + utspädningsbuffert	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9200-06 till -08 + utspädningsbuffert	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9200-10 + 9200-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 8 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9200-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av toxocarosis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9200-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Toxocara canis** E/S antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9200-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Toxocara canis** E/S antigen anses vara kliniskt signifikant.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

den diagnostiska känsligheten hos testet är 91 %. Specificiteten av reaktionen med avseende på andra parasitinfektioner är 86 %. Korsreaktivitet främst förekommer hos patienter med Trichinellosis, fascioliasis, amebiasis and strongyloidosis. Ett utmärkande drag av 96 % hittades med 500 sera av blod donerande (swiss). En detaljerad utvärdering av kiten har publicerats av Jacquier et al (1991). Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.
Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	1.067	2.383	0.960	2.152
Standardavvikelse (absorbans)	0.043	0.110	0.038	0.063
Variationskoefficient (%)	4.0	4.6	4.0	2.9

Referenser:

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

Biochema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

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

