

TOXOCARA CANIS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu toxokarózy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. 9200
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/01755



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) toxokarózy u lidí (viscerální nebo oční syndrom *larva migrans*).
Potvrzení podezřelých klinických případů a séro-epidemiologických průzkumů.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících larvální antigeny vylučovanými (E/S) **Toxocara canis**. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Senzitivované destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

| | | | | |
|--------------------|---------|---|-----|----------|
| WELL | 9200-01 | Oddělitelné proužky ELISA obsahující E/S antigeny Toxocara canis | 96 | destiček |
| DILB | 9200-02 | Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x) | 50 | ml |
| WASH | 9200-03 | Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9200-04 | Enzymatický tlumicí roztok | 50 | ml |
| STOP | 9200-05 | Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9200-06 | Negativní kontrolní sérum | 200 | μl |
| CONTROL -/+ | 9200-07 | Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou) | 200 | μl |
| CONTROL + | 9200-08 | Pozitivní kontrolní sérum | 200 | μl |
| CONJ | 9200-09 | Protein A – konjugát alkalické fosfatázy | 300 | μl |
| SUBS | 9200-10 | Substrát fosfatázy | 20 | tablet |
| | | Nádoba s více pipetami, 25 ml | 1 | kus |
| | | Rámeček pro držák 8 destiček ELISA | 1 | kus |

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9200-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9200-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9200-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 μ l kontrolního séra 9200-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9200-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9200-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9200-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9200-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9200-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9200-02, 9200-03, 9200-04 a 9200-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 9200-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9200-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9200-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

| | | | Celkový počet použitých destiček | | | |
|--|---|-------------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 |
| Tlumicí roztok na ředění (10 x) | 9200-02 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Vyplachovací roztok (10 x) | 9200-03 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Konjugát | 9200-09 + tlumicí roztok na ředění | μ l + μ l | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Kontrolní sérum | 9200-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění | μ l + μ l | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 |
| Testované sérum | Sérum + tlumicí roztok na ředění | μ l + μ l | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| Roztok substrátu | 9200-10 + 9200-04 | tabl. + ml | 1 + 2,5 | 1 + 2,5 | 1 + 2,5 | 1 + 2,5 |

Postup:

Krok 1: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 8 % A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9200-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů toxokarózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9200-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenem E/S **Toxocara canis** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9200-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenem E/S **Toxocara canis** považována za klinicky významnou.

Citlivost a specificita analýzy:

Citlivost diagnózy stanovené testem činí 91 %. Specificita reakce s ohledem na další parazitické infekce činí 86 %. K příčné reaktivitě dochází převážně u pacientů s trichinelózou, fascioliazou, amebiázou a strongyloidózou. Specificita o hodnotě 96 % byla zjištěna u 500 sér dárců krve (Švýcarsko). Podrobné vyhodnocení sady publikoval Jacquier *et al.* (1991). Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze. Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

| | Opakovatelnost | | Reprodukovatelnost | |
|---|----------------|----------|--------------------|----------|
| | Vzorek 1 | Vzorek 2 | Vzorek 1 | Vzorek 2 |
| Průměr (absorbance) | 1,067 | 2,383 | 0,960 | 2,152 |
| Standardní odchylka (absorbance) | 0,043 | 0,110 | 0,038 | 0,063 |
| Koeficient odchylky (%) | 4,0 | 4,6 | 4,0 | 2,9 |

Reference:

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.

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

