

# TOXOCARA CANIS

## Enzymový imunotest na diagnózu ľudskej toxokarózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie

Návod na použitie pre artikel č. **9200**  
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/01755



### Plánované použitie:

Súprava Bordier *Toxocara canis* ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Toxocara canis* v ľudskom sére. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

### Pozadie:

Toxokariáza je celosvetová zoonóza spôsobená *Toxocara canis*, parazitická hlístnica psov alebo *T. mystax* mačiek. Ľudia môžu byť infikovaní náhodným požitím embryonovaných vajíčok *Toxocara*. Črevné vyliahnutie lariev *Toxocara* z vajej im umožňuje migrovať do širokej škály tkanív vrátane pečene, pľúc, svalov, mozgu alebo očí. Väčšina infikovaných ľudí nevykazuje žiadne príznaky. Avšak v niektorých prípadoch migrujúce larvy môžu indukovať syndrómy Visceral Larva Migrans (VLM) alebo Ocular Larva Migrans (OLM). Diagnóza je založená na prítomnosti príznakov VLM (eozinofília, horúčka, kašeľ, bolesť brucha, hepatomegália a vyrážky) alebo OLM (očné problémy) a história expozície a pozitívny výsledok sérologickým testovaním.

### Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitivovaných larválnymi antigénmi vylučovanými / vylúčenými škrkavkou psou *Toxocara canis*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalickéj fosfatázy. Druhý premývacie krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalickéj fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Toxocara canis* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodoštičiek ELISA.

Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

### Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

<b>WELL</b>	9200-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi vylučovanými / vylúčenými škrkavkou psou <i>Toxocara canis</i>	96	jamky
<b>DILB</b>	9200-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
<b>WASH</b>	9200-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9200-04	Enzymový tlmivý roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9200-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9200-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9200-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9200-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
<b>CONJ</b>	9200-09	Proteín A - konjugát alkalickéj fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
<b>SUBS</b>	9200-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

### **Trvanlivosť a uskladnenie:**

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8°C (preprava pri teplote okolia), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

### **Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:**

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

### **Príprava reagentov pred použitím:**

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

**Jamky ELISA:** otvorte hliníkovú tašku 9200-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

**Tlmivý riediaci roztok:** rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9200-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

**Premývací roztok:** rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9200-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalické fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Kontrolné séra:** rozriedte 10 µl kontrolných sér 9200-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Konjugát:** rozriedte konjugát 9200-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

**Roztok substrátu:** rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9200-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9200-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

**Zastavovací roztok:** použite reagent 9200-05, nezriedený.

### **Odber a príprava vzoriek:**

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladujte pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

### **Upozornenie a prevencia:**

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9200-02	0.1 %	0.02 %
Premývací roztok (10 x)	9200-03	0.05 %	/
Premývací roztok	9200-04	0.01 %	/
Kontrolné séra (20 x)	9200-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Konjugát (50 x)	9200-09	0.1 %	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 9200-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9200-06 až -08) sú z králikov.
- Zaobchádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.

### **Pokyny pre likvidáciu:**

---

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

### **Postup:**

---

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

#### **Krok 1: Blokácia:**

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrášením prúžkov nad umývadlom.

#### **Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:**

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

#### **Krok 3: Inkubácia s konjugátom:**

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

#### **Krok 4: Inkubácia so substrátom:**

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

#### **Krok 5: Meranie absorbancie:**

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

### **Vyhodnotenie:**

---

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 8 % A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9200-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov toxokarózy a zdravým ľudským sérom. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti vylučovaným / vylúčeným antigénom **Toxocara canis** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti vylučovaným / vylúčeným antigénom **Toxocara canis** považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

### Citlivosť a presnosť:

Bola zistená citlivosť 91% v 78 sérach pacientov s klinicky podozrivou toxokarózou. Presnosť s výškou 96% sa vyskytla pri 500 sérach darcov krvi (švajčiarskych). Presnosť s výškou 98% sa vyskytla pri 500 sérach švajčiarskych hospitalizovaných detí (nie kvôli toxokaróze).

### Interferencie:

Vnútorne hodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické alebo ikterické séra neinterferujú s výsledkami testu.

### Precíznosť:

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu. Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	1.067	2.383	0.960	2.152
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.043	0.110	0.038	0.063
Variačný koeficient (%)	4.0	4.6	4.0	2.9

### Obmedzenia:

Zistila sa presnosť 86% u 199 sér pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa vyskytuje hlavne u pacientov s trichinellózou, fascioliazou, amebiázou a silylloidiázou.

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

### Odkazy na použitú literatúru:

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.

Radman, N.E., Archelli, S.M., Fonrouge, R.D., Guardis, M.V. and Linzitto, O.R. (2000) Human Toxocariasis. Its seroprevalence in the city of La Plata. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **95**, 281-285.

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.

Rudzinska, M., Kowalewska, B. and Sikorska, K. (2016) Clinical usefulness of western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. Parasite Immunology **39**.

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 toxocariasis in patients with eosinophilia of unknown origin. Korean J. Intern. Med. **32**, 523-529.



**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

