

TOXOCARA CANIS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu toxokarózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití

Návod k použití pro produkt č. **9200**
EC reg. č.: H-CH/CA01/IVD/01755



Předpokládané použití:

Sada ELISA *Toxocara canis* od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti larvám *Toxocara canis* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

Pozadí:

Toxokaróza je celosvětově rozšířená zoonóza, kterou způsobuje *Toxocara canis*, parazitická hlístice vyskytující se u psů nebo v podobě *T. mystax* také u koček. Lidé mohou být infikováni neúmyslným spolknutím infikovaného parazitického vajíčka *Toxocara*. Ve střevě se z vajíčka vylíhne larva škrkavky *Toxocara*, která pak může migrovat do všech možných druhů tkání včetně jater, plic, svalů, mozku nebo očí. Většina nakažených lidí nevykazuje žádné příznaky. V některých případech však mohou migrující larvy způsobovat syndromy viscerální migrény (VLM) nebo oční migrény (OLM). Diagnóza se opírá o přítomnost známek VLM (eozinofilie, horečka, kašel, bolest břicha, hepatomegalie a vyrážka) nebo OLM (oční problémy) a také o historie expozice a pozitivní výsledek sérologického testu.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunosorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících vylučované/vyměšované (E/S) larvální antigeny *Toxocara canis*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Toxocara canis* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	9200-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující E/S antigeny <i>Toxocara canis</i>	96	destiček
DILB	9200-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9200-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	9200-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	9200-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	9200-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	9200-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejich součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a µl). 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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

Příprava činidel před použitím:

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 9200-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9200-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Kontrolní sérum: Zředte 10 µl kontrolního séra 9200-06 na -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 9200-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9200-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9200-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

Zastavovací roztok: Použijte neředěné činidlo 9200-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N _a N ₃)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9200-02	0,1 %	0,02 %
Vyplachovací roztok (10 x)	9200-03	0,05 %	/
Tlumicí enzym	9200-04	0,01 %	/
Kontrolní sérum (20 x)	9200-06 až -08	0,1 %	0,02 %
Konjugát (50 x)	9200-09	0,1 %	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 9200-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9200-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

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 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdná).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky bez séra, prázdné).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena 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

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

50239_02 9200 Tch 01.2018

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9200-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů toxokarózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu E/S **Toxocara canis** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu E/S **Toxocara canis** považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

Citlivost a specificita:

Citlivost 91% byla zjištěna u 78 sér pacientů s klinickým podezřením na toxokarózu. Specificita o hodnotě 96% byla zjištěna u 500 sér dárců krve (Švýcarsko). Specificita o hodnotě 98% byla zjištěna u 500 sér dětí hospitalizovaných ve Švýcarsku (nikoliv kvůli toxokaróze).

Interference:

Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Upřesnění:

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

Omezení:

Specificita 86% byla zjištěna u 199 sér pacientů s jinými parazitickými infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s trichinelózou, fasciolózou, amébiázou a strongyloidózou.

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

Reference:

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. a Linzitto, O.R. (2000) Human Toxocarosis. 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 Toxocarosis by ELISA Using Crude Antigen of *Toxocara canis* Larvae. Korean J. Parasitol. **51**, 433-439.

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

Kim, H.B., Seo, J.W., Lee, J.H., Choi, B.S. a 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.



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

