RIDASCREEN® Toxocara IgG

Enzymimmunoassay zum Nachweis von
IgG-Antikörpern gegen Toxocara canis

Enzyme immunoassay for the detection of
IgG antibodies against Toxocara canis

Art. No.: K 7421 (96 Tests)
K 7422 (48 Tests)

In vitro Test
Lagerung bei 2 - 8°C
Storage at 2 - 8°C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
Dolivostr. 10
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-0
Sekretariat Marketing	(0 61 51) 81 02-23

Telefax / e-mail:

Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-20
e-mail:	orders@r-biopharm.de
Marketing	(0 61 51) 81 02-40
e-mail:	info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

———————

RIDA® and RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Allgemeines ... 4
2. Einleitung ... 4
3. Testprinzip ... 5
4. Packungsinhalt ... 6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör ... 6
6. Vorsichtsmaßnahmen ... 7
7. Reagenzien und ihre Lagerung ... 7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall ... 8
9. Sammlung und Lagerung der Proben ... 8
10. Testdurchführung ... 8
11. Auswertung ... 10
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation ... 11

Contents

page

1. Intended use ... 12
2. General ... 12
3. Test principle ... 13
4. Reagents provided ... 14
5. Materials required but not provided ... 14
6. Warnings and precautions for the users ... 15
7. Storage instructions ... 15
8. Indication of instability or deterioration of reagents ... 16
9. Specimen collection and storage ... 16
10. Test procedure ... 16
11. Analysis ... 18
12. Remarks about the test procedure and interpretation ... 19

Appendix

Literature ... 20

1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Toxocara IgG-Test ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen Toxocara canis in humanem Serum.

2. Einleitung

Die Toxokariasis ist eine Infektionskrankheit, die durch die Wanderung von Larven des Spulwurms Toxocara in Organen und Geweben verursacht wird.
Die Gattung Toxocara umfaßt mehrere Spezies. In der Regel wird die Erkrankung durch Larven von Toxocara canis (Hundespulwurm) ausgelöst, sie kann aber auch durch Toxocara cati (Katzenspulwurm) bedingt sein. Historisch wurde der Erkrankung wenig Bedeutung beigemessen. Inzwischen geht man aber davon aus, daß die Toxokariasis in entwickelten Ländern die zweit häufigste, durch Helminthen verursachte Infektion ist.
Infizierte Hunde und Katzen scheiden mit dem Kot Eier aus, in denen sich innerhalb von drei Wochen infektionsfähige Larven entwickeln. In diesem Stadium können die Eier mehrere Monate überdauern. Trockenheit beeinflußt die Überlebensfähigkeit jedoch negativ. Die Infektion des Menschen erfolgt über die Aufnahme der Eier aus der Umgebung (Studien in Großbritannien zeigten, daß 24 % der Bodenproben aus Parkanlagen kontaminiert sind) oder durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren, in deren Fell ebenfalls Eier haften bleiben. Nach Aufnahme schlüpfen im Darm die Larven aus den Eiern. Die Larven durchdringen die Darmwand und gelangen über den Blutweg in unterschiedliche Organe (Leber, Lunge, ZNS, Auge, Muskulatur). Es kommt zur Schädigung der Organe, ausgelöst durch die Migration der Larven und bindegewebigen Verkapselungen (ausgenommen ZNS).
Die Erkrankung äußert sich in unterschiedlichen Formen. Sie variiert von asymptomatischen Verläufen mit einer milden Eosinophilie bis hin zu schweren Organstörungen mit Hepatomegalie, Hyperglobulinämie, pulmonären Symptomen und Fieber. Bei schweren Fällen kann die Leukozytenzahl bei 100.000/mm^3 oder höher liegen mit 80 - 90 % Eosinophilen. Die Symptome können länger als ein Jahr anhalten. Lungenentzündung und neurologische Komplikationen können ebenfalls vorkommen.
Auch bei einem Befall der Augen findet man verschiedene Verläufe, die von asymptomatischen Stadien bis zu akuten Läsionen mit Endophtalmitis und dem Verlust der Sehfähigkeit reichen.
In Abhängigkeit von der Infektionsdosis und der Sensibilität des Patienten liegt die Inkubationszeit im Bereich von Wochen bis Monaten.
Die Verbreitung von Toxocara ist wahrscheinlich weltweit. In den USA und Großbritannien wird der Toxokariasis inzwischen eine größere Beachtung geschenkt, wobei die Prävalenz in anderen Länder wahrscheinlich nicht niedriger ist. Schwere Krankheitsfälle treten immer wieder sporadisch auf, wobei eher Kinder im Alter von 14 bis 40 Monaten betroffen sind als ältere Kinder. Sehr selten werden Erwachsene infiziert, was wahrscheinlich in Zusammenhang mit einer geringeren Exposition zum Erreger steht.
Das Erregerreservoir sind Katzen und Hunde, wobei bereits die Jungen über die Plazenta oder später beim Säugen infiziert werden. Im Alter von drei bis vier Wochen scheiden die Jungtiere dann mit dem Faeces Eier aus.
Der Nachweis von Toxocara-Larven mittels Leberbiopsie kann die klinische Diagnose unterstützen, ist aber meist nicht gerechtfertigt. Der Nachweis von Antikörpern gegen Toxocara im ELISA ermöglicht eine schnelle Diagnose. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die Antikörperantwort in Abhängigkeit von der Parasitenkonzentration und der Lokalisation des Befalls sehr unterschiedlich ausfallen kann. Aufgrund des Fehlens einer „Gold Standard"-Methode ist eine exakte Bestimmung der Sensitivität und Spezifität von ELISA-Tests schwierig. Allerdings konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung von aufgereinigten, exkretorischen Antigenen aus dem Larvenstadium im Vergleich zu einem Vollantigen die Sensitivität und Spezifität des ELISAs deutlich verbessert werden kann.

3. Testprinzip

An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind inaktivierte, exkretorische Antigene von Toxocara canis gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an die immobilisierten Antigene. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.
Danach erfolgt die Zugabe von Peroxidase-konjugiertem Protein A, das eine hohe Affinität zum F_C-Teil von humanen IgG-Antikörpern besitzt. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Substrat und Chromogen, das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (optional: Referenzwellenlänge ≥ 620 nm).

4. Packungsinhalt

4.1. Testkit für 96 Bestimmungen (Art. No. K 7421)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

1 x 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;
beschichtet mit inaktiviertem Toxocara canis Antigen;
in verschließbarem Alu-Beutel
1 x Probenpuffer (50 ml, pH 7,4); gebrauchsfertig, gelb gefärbt, farbloser Deckel
1 x Waschpuffer (50 ml, pH 7,4); 20fach konz., blau gefärbt, brauner Deckel
1 x Positivkontrolle (1,2 ml), roter Deckel;
inaktiviertes Humanserum, gebrauchsfertig
1 x Negativkontrolle (1,2 ml), farbloser Deckel;
inaktiviertes Humanserum, gebrauchsfertig
1 x Protein A-Konjugat (6 ml), roter Deckel;
Peroxidase-markiertes Protein A, gebrauchsfertig
1 x Substrat (6 ml), grüner Deckel;
Harnstoffperoxid, gebrauchsfertig
1 x Chromogen (6 ml), blauer Deckel;
Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
1 x Stopp-Reagenz (6 ml), gelber Deckel;
1 M Schwefelsäure
1 x Gebrauchsanleitung

4.2. Testkit für 48 Bestimmungen (Art. No. K 7422)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 48 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

1 x 6 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;
beschichtet mit inaktiviertem Toxocara canis Antigen;
in verschließbarem Alu-Beutel

Die anderen Kitbestandteile sind identisch mit Art. No. K 7421 (siehe Pkt. 4.1.).

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, evtl. Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Positiv- und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HBsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Harnstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 M Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch von Reagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfalldatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen lang haltbar.
Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.
Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Chromogen ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Chromogen nicht mehr verwendet werden.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450 nm > 0,3
- ein Extinktionswert der Positivkontrolle bei 450 nm < 0,8

9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® Toxocara IgG EIA ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.
Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.
Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 - 8 °C haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab.
Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.
Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.
Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates wird mit 19 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

50 ml des Konzentrates werden in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen lang haltbar.

10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer 1:50 verdünnt.

z. B. 10 µl Serum + 490 µl Probenpuffer

Achtung!
Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.

10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den Kontrollen und den verdünnten Seren jeweils 50 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird empfohlen die Negativkontrolle in Doppelbestimmung durchzuführen.

10.5. Waschen

Die Kavitäten werden in einen Behälter mit einem Desinfektionsmittel entleert. Um die Restfeuchtigkeit zu entfernen, sollte die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.

10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 50 µl (oder 1 Tropfen) des Protein A-Konjugates in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

10.7. Waschen

5maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von je 50 µl (oder 1 Tropfen) Substrat und Chromogen in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl (oder 1 Tropfen) Stopp-Reagenz in alle

Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (evtl. Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

Achtung:
Hoch positive Proben können zu einem dunklen Präzipitat des Chromogens führen.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des Waschpuffers
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 50 µl Positivkontrolle, Negativkontrolle (Doppelbestimmung) bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Zugabe von 50 µl (oder 1 Tropfen) Protein A-Konjugat; 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
8. Zugabe von je 50 µl (oder 1 Tropfen) Substrat und Chromogen; 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
9. Nach Zugabe von 50 µl (oder 1 Tropfen) Stopp-Reagenz photometrische Auswertung bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge ≥ 620 nm)

11. Auswertung

11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positivkontrolle und Negativkontrolle (Doppelbestimmung) mit zu führen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Positivkontrolle bei 450 nm größer 0,8 ist. Der Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle muß bei 450 nm kleiner 0,3 sein. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 25 % vom Mittelwert ab, muß der Test wiederholt werden.

11.2. Berechnung des Proben-Index

a) Der Extinktionsmittelwert der Negativkontrolle wird berechnet.
b) Zum Extinktionsmittelwert wird 0,150 addiert. Als Ergebnis erhält man den cut-off des Tests.

c) Durch Division des Extinktionswertes der Probe durch den cut-off erhält man den Proben-Index.

z. B.: Negativkontrolle 1 O.D. = 0,115
Negativkontrolle 2 O.D. = 0,125
Probe O.D. = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0{,}115 + 0{,}125}{2} + 0{,}150 = 0{,}270$$

$$\text{Proben-Index} = \frac{0{,}508}{0{,}270} = 1{,}88$$

11.3. Testergebnis

Tab. 1: Bewertung des Proben-Index

	negativ	grenzwertig	positiv
Proben-Index	< 0,9	0,9 – 1,1	> 1,1

12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® Toxocara IgG EIA weist spezifisch Antikörper gegen Toxocara canis nach. Er sollte bei begründetem Verdacht auf eine Toxokariasis durchgeführt werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild und anderen diagnostischen Befunden zu interpretieren.

Antikörpersignale sind abhängig vom Parasitenbefall und können von Patient zu Patient variieren.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Infektion mit Toxocara canis nicht aus. Zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion kann der Antikörpertiter so gering sein, daß der Test negativ oder grenzwertig ausfällt. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Toxokariasis, sollte nach zwei bis drei Wochen eine weitere Serumprobe untersucht werden.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

RIDASCREEN® Toxocara IgG

Enzyme immunoassay for the detection of
IgG antibodies against Toxocara canis

1. Intended use

The RIDASCREEN® Toxocara IgG test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of specific IgG antibodies against Toxocara canis in human serum.

2. General

Toxocariasis is an infection caused by migration of roundworm Toxocara larvae to organs and tissues.
Although the genus Toxocara includes many species including T.cati (roundworm of the cat), only T.canis (roundworm of the fox and dog) has been consistently implicated in the disease. Although Toxocara larva migrans has historically been under-reported, it is now believed to be the second most common helminth infection in developed countries.
It is usually acquired by ingestion of soil contaminated with embryonated eggs of Toxocara. Eggs reach the soil through faeces of infected cats or dogs (studies of United Kingdom's parks showed 24 % of soil samples with eggs). They need from 1 to 3 weeks incubation to get infectious, but they remain viable and infectious on the soil for many months. Desiccation affect them unfavourably. After their ingestion, embryonated eggs free in the gut the larvae, which go across gut's walls and migrate to the liver or lungs through lymphatic and circulatory systems. Larvae spread from lungs to several organs and damage them by migration and induction of granulomatous lesions.
The disease manifests itself as two distinct forms: visceral larval migrans (VLM) and ocular larval migrans (OLM).
Signs and symptoms of VLM vary from an asymptomatic state with mild eosinophilia to a severe and potentially fatal disorder, including hepatomegaly, hyperglobulinaemia, pulmonary symptoms and fever. In serious cases, the leucocytes count can reach 100000/mm^3 or more, with 80-90 % eosinophils. Symptoms can persist for one year or more. Also pneumonitis or neurological disorder can appear.
Patients with OLM also vary widely in presentation, from asymptomatic states to acute lesions in the eye, including endophthalmitis, caused by penetration of larvae in the eyes, with vision loss on the affected eye; a retina-damage similar to retinoblastoma can lead to unnecessary eye enucleation.
Incubation period may range from weeks to months, depending on infection intensity, reinfection and patient sensibility.
Distribution is probably world wide. In United States and United Kingdom the disease has been target of greater attention, but there is probably not more prevalence than in other countries. The grave form occurs sporadically in isolated cases within a family, affecting rather children from 14 to 40 months old, though occurs even to older children. Very few times, adults are infected. That lower incidence in adults and older children is rather related with a less exposition to the disease.
Disease reservoir consists of dogs and cats. Almost all cubs are infected by larvae transplacentary and transmammary migration. At 3 or 4 weeks old, the cubs begin to expel eggs in faeces.
The demonstration of the Toxocara larvae by means of liver biopsy confirms the clinical diagnosis, but it is rarely justified.
Since there is no definitive method to diagnose Toxocara infections, true sensitivity and specificity of serologic tests cannot be accurately determined. The diagnosis is further complicated by the fact that the antibody response varies widely depending on worm burden and location. However, numerous studies have shown that immunoassays using a purified excretory antigen from the larval stage have shown dramatically improved sensitivities and specificities when compared to using crude antigens.

3. Test principle

On the surface of the microtiter wells, inactivated excretory antigens of Toxocara canis are bound. Diluted serum samples and controls are pipetted into the wells and incubated at room temperature. Present antibodies bind to the immobilized antigens. Unbound material is removed in a washing step.
In a second step, a POD-conjugated Protein A is added; which has a high affinity to the F_C unit of human IgG. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (urea peroxide) and chromogen (TMB) are added to the wells and incubated at room temperature. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate/chromogen to a blue color. Addition of stop solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (optional: reference wavelength ≥ 620 nm).

4. Reagents provided

4.1. Test kit for 96 determinations (Art. No. K 7421)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with inactivated Toxocara canis antigen;
in a resealable foil bag
1 x Sample Buffer (50 ml, pH 7.4), ready to use, dyed yellow, colorless lid
1 x Washing Buffer (50 ml, pH 7.4), 20x conc., dyed blue, brown lid
1 x Positive Control (1.2 ml), red lid;
inactivated human serum, ready to use
1 x Negative Control (1.2 ml), colorless lid;
inactivated human serum, ready to use
1 x Protein A Conjugate (6 ml), red lid;
HRP-conjugated Protein A, ready to use
1 x Substrate (6 ml), green lid;
urea peroxide, ready to use
1 x Chromogen (6 ml), blue lid;
tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
1 x Stop Solution (6 ml), yellow lid;
1 M sulfuric acid
1 x Instructions for use

4.2. Test kit for 48 determinations (Art. No. K 7422)

The reagents in one package are sufficient for 48 determinations.
Each test kit contains:

1 x 6 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with inactivated Toxocara canis antigen;
in a resealable foil bag

Other kit components are identical to Art. No. K 7421 (see point 4.1.).

5. Reagents required but not provided

5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

5.2 Accessories

- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, optional: reference wavelength ≥ 620 nm)
- Absorbent paper

6. Warnings and precautions for the users

The control sera (positive and negative control) have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The stop solution contains 1 M sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of reagents between kits of different lot numbers is not possible.

7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.
The diluted washing buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 - 8 °C.
Allow reagents and microwell strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.
The colorless chromogen must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the chromogen has turned blue, the reagent should be discarded.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless chromogen prior to its use
- an absorbance value (O.D.) of the negative control at 450 nm > 0.3
- an absorbance value (O.D.) of the positive control at 450 nm < 0.8

9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® Toxocara IgG EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.
The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.
Diluted samples can be used for up to 7 hours if they have been stored at 2 - 8 °C.

10. Test procedure

10.1. Preliminary comments

Bring all reagents and the microwell strips for at least 30 minutes to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences.
During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.
Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.
Except the washing buffer, all reagents are ready to use.

10.2. Preparation of the washing buffer

1 part of the concentrated washing buffer is diluted with 19 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C.
Add 50 ml of the concentrated washing buffer to a 1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted washing buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 - 8 °C.

10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted 1:50 with the sample buffer.

e.g. 10 µl serum + 490 µl sample buffer

Attention!
The controls included in the kit are ready to use and must not be diluted.

10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 50 µl of the positive control, the negative control and the diluted sera are pipetted into the wells and incubated for 15 min at room temperature. It is recommended to include two negative controls in each run.

10.5. Washing

Decant or aspirate all microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 5 times with 300 µl of prepared washing buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after single washing steps.

If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.

10.6. Second incubation

Add 50 µl or 1 drop of protein A conjugate to all wells. Incubate the plate for 15 min at room temperature.

10.7. Washing

Wash 5 times according to step 10.5.

10.8. Third incubation

Add 50 µl or 1 drop of substrate and 50 µl or 1 drop of chromogen into each well. Incubate the plate for 15 min at room temperature. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 50 µl or 1 drop of stop solution to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (optional: reference wavelength ≥ 620 nm).

Remark:
Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen.

Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the washing buffer
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 50 µl of the positive control, the negative control (in duplicate) or the diluted samples into the microwells; 15 minutes incubation at room temperature
5. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of washing buffer
6. Add 50 µl or 1 drop of protein A conjugate; 15 minutes incubation at room temperature
7. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of washing buffer
8. Add 50 µl or 1 drop each of substrate and chromogen; 15 min incubation at room temperature
9. After addition of 50 µl or 1 drop stop solution spectophotometric determination at 450 nm (optional: reference wavelength ≥ 620 nm)

11. Analysis

11.1. Quality control

For the quality control, positive control and negative control (double determination) must be carried along with each test procedure. The test was carried out correctly, if the positive control shows an absorbance value (O.D.) at 450 nm greater than 0.8. The mean absorbance value of the negative control at 450 nm must show a value lower than 0.3. If the single measurements diverge from the mean absorbance value more than 25 %, the test must be repeated.

11.2. Calculation of the sample ratio

a) Calculate the average O.D. of the negative control.
b) Add 0.150 to the average O.D. The result is the cut-off value of the assay.
c) Calculate the sample ratio by dividing the sample O.D. through the cut-off value obtained in point b).

e.g.: negative control well 1 O.D. = 0.115
negative control well 2 O.D. = 0.125
sample O.D. = 0.508

$$\text{cut-off value} = \frac{0.115 + 0.125}{2} + 0.150 = 0.270$$

$$\text{sample ratio} = \frac{0.508}{0.270} = 1.88$$

11.3. Test result

Tab. 1: Valuation of sample ratio

	negative	equivocal	positive
Sample ratio	< 0.9	0.9 - 1.1	> 1.1

12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN® Toxocara IgG EIA detects specifically antibodies against Toxocara canis. It should be used in suspected cases of toxocariasis. Assay results should always be interpreted in connection to the clinical diagnosis and other diagnostic results.

Antibody response is highly variable in regard to parasite location and each individual.

Negative antibody findings cannot exclude an Toxocara infection. Due to low antibody titer at very early time of an infection, the test can show negative or equivocal results. If a clinical suspicion subsists, after two to three weeks another patient's sample should be tested.

A positive result does not exclude the presence of other pathogens.

Appendix

Literature

1. Brunello, F., Falagiani, P. and Genchi, C.: Enzyme Immunoassay (ELISA) for the Detection of Specific IgG Antibodies to Toxocara canis ES Antigens. Boll. Ist. sieroter. milan., Vol. 65#1, 1986, pp. 54-60.
2. Carlier, Y. et. al.: The Use of an Excretory-Secretory Antigen for an ELISA Specific Serodiagnosis of Visceral Larva Migrans. Biomedicine, Vol. 36, 1982, pp. 39-42.
3. Clemett, R. et. al.: Ocular Toxocara canis Infections: Diagnosis by Enzyme Immunoassay. Aust & NZ J Opthal, Vol. 15, 1987, pp. 145-150.
4. Glickman, L., Schantz, P. and Grieve, R.: Toxocariasis. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Vol. 1, Helminthic Diseases. Ed. Walls and Schantz. Academic Press, 1986, pp. 201-231.
5. Jacquier, P. et. al.: Immunodiagnosis of Toxocarosis in Humans: Evaluation of a New Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit. J. Clin Micro, Vol. 29#9, Sept. 1991, pp. 1831-1835.
6. Schantz, P.: Toxocara Larva Migrans Now. Am J Trop Med Hyg, Vol. 41 (Sup 3), 1989, pp. 21-34.
7. Sloan, L. and Kagan, I.: Evaluation of an Immunoassay for the Serological Diagnosis of Toxocariasis in Humans. Poster Session C-442, ASM National Meeting, New Orleans, LA, May 1992

RIDASCREEN® Toxocara IgG 00-04-26