

STRONGYLOIDES RATTI

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Strongyloidiasis

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9450**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01757



Anwendungsgebiet:

Das Bordier *Strongyloides ratti* ELISA Nachweisverfahren dient der quantitativen Bestimmung von IgG Antikörpern gegen Strongyloides in humanem Serum.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit **Strongyloides ratti** somatisches Larven Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9450-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit Strongyloides ratti somatisches Larven Antigen	96	Wells
DILB	9450-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9450-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9450-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9450-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9450-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9450-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9450-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9450-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9450-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9450-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9450-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9450-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9450-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9450-10 im Puffer 9450-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9450-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9450-02, 9450-03, 9450-04 und 9450-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9450-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9450-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9450-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9450-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9450-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9450-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9450-10 + 9450-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) $< 0,350$ ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle $> 1,200$ sein und die der Negativ-Kontrolle $< 12\%$ von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9450-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Strongyloidiasis und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9450-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Strongyloides ratti** somatisches Larven-Antigen als nicht signifikant angesehen. Bei starkem Verdacht auf Strongyloides sollten andere Nachweisverfahren durchgeführt werden (Baermann, Stuhlkultur, mehrfache Stuhluntersuchungen).

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9450-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Strongyloides ratti** somatisches Larven-Antigen als signifikant angesehen. Das Ergebnis sollte die Kreuzreaktivität mit anderen parasitischen Infektionen (unten genannt), die endemische Situation, sowie klinische Symptome mit einbeziehen.

Sensitivität und Spezifität:

Eine Sensitivität von 88% wurde bei einer Gruppe von 48 Seren von Patienten mit der *Strongyloides stercoralis* Larve gefunden.

Eine Spezifität von 94% wurde bei einer Gruppe von 100 Seren von Blutspendern (Schweiz) gefunden.

Der Test mit 89 Seren von 2 Patientengruppen mit anderen Parasitosen (Amöbiose, Askariasis, Zystizerkose, Fasziole, Filariose, Echinokokkose, Schistosomiasis und Toxocarisis) zeigte eine Spezifität von 77%. Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.738	1.320	0.768	1.339
Standardabweichung (A Wert)	0.040	0.040	0.052	0.063
Variationskoeffizient (%)	5.5	3.0	6.8	4.7

Referenzen:

Magnaval, J.F., Mansuy, J.M., Villeneuve, L. and Cassaing S. (2000) A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). *European journal of Epidemiology* **16** : 179-182.

Schaffel, R., Nucci, M., Carvalho, E., Braga, M., Almeida, L., Portugal, R. and Pulcheri, W. (2001) The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65** : 346-350.

Loutfy, M. R, Wilson, M., Keystone, J. S. and Kain, K. C. (2002) Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in non endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* : 749-752.

van Doorn, H.R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J.C.F.M., Wismans, P. J., Sarfati, C., Vervoort, T., van Gool, T. (2007) Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 438-442.

Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., et al. (2014) Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**.

Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Kroleiecki, A., Albonico, M., et al. (2015) Accuracy of Five Serologic Tests for the follow-up of *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**.



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

