

# STRONGYLOIDES RATTI

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Strongyloidiasis

96 Tests in einzelnen Wells für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9450**  
EC reg. Nr.: H-CH/CA01/IVD/10285



## Anwendungsgebiet:

Der Bordier Strongyloides ratti ELISA-Kit ist zum quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Strongyloides*-Nematoden in humanem Serum bestimmt. Serologie ist eine Diagnosehilfe und kann nicht als alleinstehende Methode zur Diagnosestellung verwendet werden.

## Hintergrund-Informationen:

Strongyloidiasis wird von *Strongyloides-stercoralis*-Nematoden verursacht. Die Ansteckung des Menschen kann durch Kontakt mit der von *Strongyloides*-Larven kontaminierter Erde erfolgen. Die Larven können in den Körper an ungeschützten Hautstellen (nackte Füße) perkutan eindringen. Meistens verläuft die Erkrankung vollständig asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen wie Bauchschmerzen, Übelkeit, Durchfall, Husten oder Ausschlag. Bei immunsupprimierten, mit Kortikoidensteroiden behandelten und bei HIV-Patienten kann es allerdings im Rahmen einer disseminierten Strongyloidiasis zu einer Sepsis kommen. Die Diagnosestellung erfolgt anhand von Stuhlproben und positiven serologischen Testergebnissen.

## Testprinzip:

Die Testpackung enthält das komplette benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er brechbaren Mikrotiterplatte, deren Wells mit **Strongyloides ratti** somatischem Larven Antigen beschichtet sind. Spezifische Antikörper werden sich an das Antigen anheften, wobei unspezifische Bestandteile durch Abwaschen entfernt werden können. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Beim wiederholten Abwaschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt mit pNPP-Substrat, der bei Kontakt mit alkalischer Phosphatase gelb wird. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge von spezifischen *Strongyloides ratti*-Antikörpern in der Probe. Die Reaktion wird mit Dikaliumhydrogenphosphat unterbrochen. Zum Auslesen der Absorbanz bei 405 nm wird ein ELISA-Microplattenleser verwendet.

Eine Automatisierung des Tests ist möglich, muss aber vom Anwender validiert werden.

## Kitbestandteile (96 Tests):

<b>WELL</b>	9450-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <b>Strongyloides ratti</b> somatisches Larven Antigen	96	wells
<b>DILB</b>	9450-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat, violette Färbung	50	ml
<b>WASH</b>	9450-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9450-04	Enzympuffer	50	ml
<b>STOP</b>	9450-05	Stopp Lösung (0,5 M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9450-06	Negatives Kontroll-Serum (20 x), grüne Verschlusskappe	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9450-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum (20 x), gelbe Verschlusskappe	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9450-08	Positives Kontroll-Serum (20 x), rote Verschlusskappe	200	µl
<b>CONJ</b>	9450-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat (50 x), violette Verschlusskappe	300	µl
<b>SUBS</b>	9450-10	Phosphatase Substrat (para-Nitrophenylphosphat)	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

### **Verfallsdatum und Lagerung:**

Lagerung des Kits bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Die Komponenten sollten direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt werden. Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Das Verfallsdatum nach dem Öffnen der Reagenzien ist bei einer Lagertemperatur von 2-8°C gültig.

### **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. Manuelle oder automatische Ausrüstung zum Spülen der Wells. Vortexmischer. Stoppuhr.

### **Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:**

Alle Reagenzien vor der Anwendung auf Raumtemperatur bringen und gut vermischen.

**Mikrotiterstreifen:** Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9450-01) entnehmen (einen Teststreifen für die Blindprobe und drei Teststreifen für die Kontrollen plus die Anzahl der Proben). 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. Dies wird für die Verdünnung von Kontroll-Serum, Proben und Konjugaten verwendet. Der Verdünnungspuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

**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. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

**Kontroll-Serum:** Je 10 µl der Kontrollseren 9450-06 bis -08 mit 190 µl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt). Das verdünnte Kontrollserum ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

**Konjugat:** Das Konzentrat 9450-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:50 verdünnt. Die Verdünnung des Konjugats muss am Tag der Probeentnahme stattfinden. Verdünntes Konjugat nicht lagern.

**Substrat-Lösung:** Die Substrattabletten 9450-10 in unverdünntem Enzympuffer 9450-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen. Substrat am Tag der Probeentnahme verdünnen und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Tabletten und Substratlösungen sollten eine leicht gelbliche oder keine Färbung aufweisen. Tabletten und Substrate mit einer gelben Färbung sollten aufgrund möglicher Hydrolysisierung entsorgt werden. Substratlösung nicht lagern.

**Stopp-Lösung:** Reagenz 9450-05 gebrauchsfertig.

### **Probenvorbereitung und –Lagerung:**

Humanes Serum verwenden. Serum, das innerhalb von wenigen Tagen untersucht werden soll, sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Anderenfalls sollte es bei -20°C oder tiefer eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Probenmaterial mischen und 1:201 in Verdünnungspuffer Lösung auflösen (z.B. 5 µl Probe in 1,0 ml).

### **Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:**

Die Mengen der giftigen Substanzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Komponente	Referenz	Natriumazid (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Thiomersal
Verdünnungspuffer (10 x)	9450-02	0.1 %	0,02 %
Waschpuffer (10 x)	9450-03	0.05 %	/
Enzympuffer	9450-04	0.01 %	/
Kontrollserum (20 x)	9450-06 to -08	0.1 %	0,02 %
Konjugat (50 x)	9450-09	0.1 %	/

Natriumazid und Thiomersal in den angegebenen Konzentrationen sind bei Haut- oder Schleimhautkontakt nicht giftig.

- Die Stopp-Lösung 9450-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ist reizend.
- Die Kontrollseren (9450-06 bis -08) wurden aus Kaninchen gewonnen.
- Alle Reagenzien und Proben sollten als potenziell ansteckendes Material behandelt werden.
- Reagenzien zwischen einzelnen Einheiten und Bordier ELISA-Kits nicht austauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht zusammen mit den Reagenzien aus diesem Kit verwenden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht verwenden.
- Reagenzflaschen unmittelbar nach Gebrauch dicht verschliessen. Flaschendeckel dürfen nicht vertauscht werden, um gegenseitige Kontamination zu vermeiden.
- Separate und saubere Pipettenspitzen für jede Patientenprobe verwenden.
- Mikrowells nur einmal verwenden.

### **Entsorgung:**

---

Die in diesem Test verwendeten Materialien gelten als gefährliche Abfälle. Entsorgung gefährlicher Abfälle muss entsprechend den nationalen und regionalen Rechtsvorschriften stattfinden.

### **Durchführung:**

---

Blasenbildung während des Nachweisverfahrens vermeiden.

#### **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. Für Nachweisverfahren mit mehr als 25 Proben wird eine Duplikaterstellung mit den drei verbleibenden Wells empfohlen.

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 ~ 250 µl Waschlösung waschen.

#### **Schritt 3: Konjugat-Inkubation:**

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren (einschliesslich serumfreier Blankwert).

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

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 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, falls notwendig, abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei  $\lambda = 405$  nm innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe der Stopp-Lösung messen.

### **Ergebnis-Auswertung:**

---

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1.200
- A der negativen Kontrolle < 12 % der A der positiven Kontrolle
- A des Blank gegen Luft < 0.350

Qualitätskontrollen aktueller Testeinheiten sind auf unserer Internetseite zu finden: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

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. Die Cutoff-Index einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **1.0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Strongyloides ratti**-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1.0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Strongyloides ratti**-Antigen als signifikant angesehen. Es zeigt, dass der Patient Kontakt mit dem Parasiten hatte.

Die Unsicherheitsbereich sollte von jedem Labor ausgehend von der Patientenpopulation einzeln definiert werden. Bei Ergebnissen im Unsicherheitsbereich wird eine Wiederholung des Tests mit einer neuen Probe nach 2 bis 4 Wochen empfohlen.

### Sensitivität und Spezifität:

Eine Sensitivität von 90% wurde bei einer Gruppe von 59 Seren von Patienten mit Larven von *Strongyloides stercoralis* ermittelt. Bei bestehendem starken Verdacht auf Strongyloidiasis sollten andere Untersuchungsmethoden hinzugezogen werden (Baermann-Verfahren, Stuhlproben, Stuhlkulturen). Eine Spezifität von 96% wurde bei einer Gruppe von 150 Seren von schweizer Blutspendern ermittelt.

### Wechselwirkungen:

Interne Untersuchungen ergaben, dass hämorrhagisches, lipämisches oder ikterisches Serum die Testergebnisse nicht beeinflusst.

### Genauigkeit:

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
<b>Durchschnitt (A Wert)</b>	0.738	1.320	0.768	1.339
<b>Standardabweichung (A Wert)</b>	0.040	0.040	0.052	0.063
<b>Variationskoeffizient (%)</b>	5.5	3.0	6.8	4.7

### Grenzen:

Eine Spezifität von 77% wurde bei einer Gruppe von 89 Seren von Patienten mit anderen Parasiteninfektionen ermittelt. Kreuzreaktivität tritt vor allem bei Patienten mit Schistosomiasis, Filariose, Toxocariasis, Fasziose und Amöbiasis auf.

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand von Ergebnissen eines einzelnen Tests erfolgen. Die vollständige Diagnosestellung sollte unter Berücksichtigung der endemischen Situation, Krankengeschichte und Symptomatik sowie unter Verwendung von bildgebenden Verfahren sowie serologischen Daten stattfinden.

Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten haben die serologischen Daten eine beschränkte Aussagekraft.

### Referenzen:

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.

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**.

Formenti, F., Buonfrate, D., Prandi, R., Marquez, M., Caicedo, C., Rizzi, E., Guevara, A.G., Vicuña, Y., Huerlo, F.R., Perandin, F., Bisoffi, Z. and Anselmi, M. (2016) Comparison of *S. stercoralis* Serology Performed on Dried Blood Spots and on Conventional Serum Samples. Front. Microbiol. **7**:1778.



**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

