

STRONGYLOIDES RATTI

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de estrogiloidíase humana

96 ensaios em poços individuais



Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9450
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/10285

Utilização prevista:

O kit ELISA para *Strongyloides ratti* da Bordier destina-se à determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG contra estrogiloides em soro humano.

Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em poços de microplaca sensibilizados com antígenos somáticos larvares de *Strongyloides ratti*. A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

Material incluído no kit (96 ensaios):

WELL	9450-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com Antígenos somáticos larvares de <i>Strongyloides ratti</i>	96	poços
DILB	9450-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x)	50	ml
WASH	9450-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Tampão da enzima	50	ml
STOP	9450-05	Solução de paragem (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Soro de controlo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Soro fracamente positivo (cut off)	200	µl
CONTROL +	9450-08	Soro de controlo positivo	200	µl
CONJ	9450-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina	300	µl
SUBS	9450-10	Substrato de fosfatase	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

Preparação de reagentes antes da sua utilização:

Poços ELISA: abrir a parte lateral do saco de alumínio 9450-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

Tampão de diluição: diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9450-02, 1/10 em água destilada.

Solução de lavagem: diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9450-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

Soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10 µl de soros de controlo 9450-06 a -08 em 190 µl de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

Soros a testar: diluir 10 µl de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 9450-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

Solução de substrato: pré aquecer o tampão da enzima 9450-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9450-10 em tampão não diluído 9450-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

Solução de paragem: utilizar reagente 9450-05 não diluído.



Advertências e precauções: as soluções 9450-02, 9450-03, 9450-04 e 9450-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio (NaN₃). A solução 9450-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 9450-05 (0,5 M K₃PO₄) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9450-06 a -08) são de coelhos.

Volumes a preparar:

			Quantidade total de poços a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampão de diluição (10 x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Solução de lavagem (10 x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9450-09 + tampão de diluição	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Soros de controlo	9450-06 a -08 + tampão de diluição	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Soros a testar	Soro + tampão de diluição	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solução de substrato	9450-10 + 9450-04	past. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedimento:

Passo 1: bloqueio:

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

Passo 2: incubação com amostras séricas:

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 3: incubação com conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 4: incubação com substrato:

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

Passo 5: medição das absorvâncias:

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 12 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9450-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de *Strongyloides* e soros humanos saudáveis.

O resultado é **negativo** quando a absorvância da amostra analisada é inferior à absorvância do soro fracamente positivo 9450-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos larvares somáticos de *Strongyloides ratti* é clinicamente não significativa. Se existir uma forte suspeita de *Strongyloides*, devem ser aplicadas outras técnicas (Baermann, cultura fecal, exames de várias fezes).

O resultado é **positivo** quando a absorvância da amostra analisada é superior à absorvância do controlo fracamente positivo 9450-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos larvares somáticos de *Strongyloides ratti* é considerada clinicamente significativa. Este resultado deve ter em consideração as reatividades cruzadas de outras infeções parasitárias (mencionadas a seguir), a situação endémica e os sintomas clínicos.

Sensibilidade e especificidade do ensaio:

Foi detetada uma sensibilidade de 88% com 48 soros de doentes com larvas de *Strongyloides stercoralis*.

Foi detetada uma especificidade de 94% com 100 soros de doadores de sangue (suíços).

O teste de 89 soros de dois grupos de doentes com outras parasitoses (amebíase, ascaridíase, cisticercose, fasciolíase, filariase, equinococose cística, esquistossomose e toxocaríase) mostrou uma especificidade de 77%. A avaliação interna realizada mostrou que soros hemorrágicos, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio.

A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média (absorvância)	0,738	1,320	0,768	1,339
Desvio padrão (absorvância)	0,040	0,040	0,052	0,063
Coefficiente de variação (%)	5,5	3,0	6,8	4,7

Referências:

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

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Tel.: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

