

STRONGYLOIDES RATTI

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej strongyloidózy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. **9450**
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/10285



Plánované použitie:

Táto súprava Bordier *Strongyloides ratti* ELISA je určená na kvantitatívnu determináciu IgG protilátok proti druhu *Strongyloides* v ľudskom tele.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitizedovaných somatickými larválnymi antigénmi ***Strongyloides ratti***. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalického fosfatázy. Senzitizedované platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9450-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedované somatickými larválnymi antigénmi <i>Strongyloides ratti</i>	96	jamky
DILB	9450-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9450-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9450-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9450-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9450-09	Proteín A – konjugát alkalického fosfatázy	300	µl
SUBS	9450-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μ l). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9450-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysúšacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9450-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9450-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μ l kontrolných sér 9450-06 až -08 v 190 μ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μ l séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9450-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9450-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9450-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9450-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9450-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9450-02, 9450-03, 9450-04 a 9450-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 9450-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9450-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9450-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9450-09 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9450-06 až -08 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9450-10 + 9450-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 12 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9450-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov strongyloidózy a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9450-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti somatickým larválnym antigénom ***Strongyloides ratti*** klinicky zanedbateľná. Ak je silné podozrenie na strongyloidózu, je potrebné vykonať ďalšie testy (Baermann, kultivácia stolice, viacnásobné testy stolice).

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než absorbanca slabého pozitívneho séra 9450-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti somatickým larválnym antigénom ***Strongyloides ratti*** považovaná za klinicky významnú. Pri tomto výsledku treba zohľadniť skríženú reaktivitu iných parazitických infekcií (uvedené nižšie), endemickú situáciu a klinické symptómy.

Citlivosť a presnosť testu:

Citlivosť testu vo výške 88 % bola spozorovaná pri 48 sérach pacientov s larvami *strongyloides stercoralis*.

Presnosť s výškou 94 % sa vyskytla pri 100 sérach darcov krvi (švajčiarskych).

Test 89 sér od 2 skupín pacientov s inými parazitárnymi chorobami (amebiáza, askarióza, cysticerkóza, fasciolóza, filarióza, cystická echinokokóza, schistosomiáza a toxokaróza) preukázal presnosť vo výške 77%. Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.738	1.320	0.768	1.339
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.040	0.040	0.052	0.063
Variačný koeficient (%)	5.5	3.0	6.8	4.7

Odkazy na použitú literatúru:

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.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

