

# STRONGYLOIDES RATTI

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human Strongyloidosis

96 analyser på særskilte brønde



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9450

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/10285

## Tilsigtet anvendelse:

Bordier Strongyloidosis ratti ELISA kittet er beregnet til kvantitativ bestemmelse af IgG-klasse antistoffer mod Strongyloidosis i humant serum.

## Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med **Strongyloidosis ratti** somatiske larve-antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

## Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

|                    |         |   |     |           |
|--------------------|---------|---|-----|-----------|
| <b>WELL</b>        | 9450-01 | Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <b>Strongyloidosis ratti</b> somatiske larve-antigener | 96  | brønde    |
| <b>DILB</b>        | 9450-02 | Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat   | 50  | ml        |
| <b>WASH</b>        | 9450-03 | Vaskeløsning (10 x) koncentrat  | 50  | ml        |
| <b>ENZB</b>        | 9450-04 | Enzym buffer  | 50  | ml        |
| <b>STOP</b>        | 9450-05 | Stopløsning (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )   | 25  | ml        |
| <b>CONTROL</b> -   | 9450-06 | Negativt kontrolserum   | 200 | µl        |
| <b>CONTROL</b> -/+ | 9450-07 | Svagt positivt serum  | 200 | µl        |
| <b>CONTROL</b> +   | 9450-08 | Positivt kontrolserum   | 200 | µl        |
| <b>CONJ</b>        | 9450-09 | Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat   | 300 | µl        |
| <b>SUBS</b>        | 9450-10 | Fosfatase-substrat  | 20  | tabletter |
|                    |         | Multipipette beholder, 25 ml  | 1   | stykke    |
|                    |         | Ramme til ELISA 8-brønd holder  | 1   | stykke    |

## Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

## Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and  $\mu$ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

## Klargøring af reagens inden anvendelse:

**Elisa brønde:** åbn siden af aluminiumstasken 9450-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepudd.

**Fortyndingsbuffer:** fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9450-02, 1/10 i destilleret vand.

**Vaskeløsning:** fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9450-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10  $\mu$ l kontrolsera 9450-06 til -08 i 190  $\mu$ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

**Sera, som skal testes:** fortynd 10  $\mu$ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9450-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

**Substratløsning:** forvarm enzymbuffer 9450-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9450-10 i ufortyndet buffer 9450-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

**Stopløsning:** anvend reagens 9450-05 ufortyndet.



**Advarsler og sikkerhedshensyn:** Løsninger 9450-02, 9450-03, 9450-04 og 9450-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid ( $N_3Na$ ). Løsning 9450-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9450-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9450-06 til -8) er fra kaniner.

## Volumener, som skal klargøres:

|                                 |                                       |                   | Det totale antal brønde, som skal anvendes: |           |           |           |
|---------------------------------|---------------------------------------|-------------------|---|-----------|-----------|-----------|
|                                 |                                       |                   | 3-4   | 5-6       | 7-8       | 9-10      |
| <b>Fortyndingsbuffer (10 x)</b> | 9450-02 + H <sub>2</sub> O            | ml + ml           | 1 + 9                                       | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Vaskeløsning (10 x)</b>      | 9450-03 + H <sub>2</sub> O            | ml + ml           | 1 + 9                                       | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Konjugat</b>                 | 9450-09 +<br>fortyndingsbuffer        | $\mu$ l + $\mu$ l | 10 + 500                                    | 15 + 750  | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| <b>Kontrolsera</b>              | 9450-06 til -8 +<br>fortyndingsbuffer | $\mu$ l + $\mu$ l | 10 + 190                                    | 10 + 190  | 10 + 190  | 10 + 190  |
| <b>Sera, som skal testes</b>    | Serum +<br>fortyndingsbuffer          | $\mu$ l + $\mu$ l | 10 + 2000                                   | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| <b>Substratløsning</b>          | 9450-10 + 9450-04                     | tabl. + ml        | 1 + 2,5                                     | 1 + 2,5   | 1 + 2,5   | 1 + 2,5   |

## **Procedure:**

### **Trin 1: Blokering:**

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

### **Trin 2: Inkubation med serumprøver:**

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 3: Inkubation med konjugat:**

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

### **Trin 4: Inkubation med substrat:**

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

### **Trin 5: Måling af absorbanser:**

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

## Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 12 % af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9450-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af strongyloides og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9450-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Strongyloides ratti** somatiske larve-antigener klinisk ikke-signifikant. Hvis der er stærk mistanke om strongyloidosis, bør der anvendes andre teknikker (Baerman, fækal kultur, multiple afføringsundersøgelser).

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af den svagt positive kontrol 9450-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Strongyloides ratti** somatiske larve-antigener for at være klinisk signifikant. Dette resultat bør inddrage krydsreaktiviteter af andre parasitinfektioner (understående), den endemiske situation og de kliniske symptomer.

## Analysens sensitivitet og specificitet:

En sensitivitet på 88% blev fundet med 48 sera fra patienter med larver af strongyloides stercoralis.

En specificitet på 94% blev fundet med 100 sera fra bloddonorer (schweiziske).

Testen af 89 sera fra 2 grupper af patienter med andre parasitoser (Amebiasis, Ascariasis, Cysticercosis, Fasciolosis, filariasis, cystisk echinococcosis, Schistosomosis og Toxocarosis) viste en specificitet på 77%. Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultateterne af testen.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

|                               | Repetérbarhed |         | Reproducerbarhed |         |
|-------------------------------|---------------|---------|------------------|---------|
|                               | Prøve 1       | Prøve 2 | Prøve 1          | Prøve 2 |
| Gennemsnit (absorbans)        | 0,738         | 1,320   | 0,768            | 1,339   |
| Standardafvigelse (absorbans) | 0,040         | 0,040   | 0,052            | 0,063   |
| Variationskoefficient (%)     | 5,5           | 3,0     | 6,8              | 4,7     |

## Referencer:

**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**.

**Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., et al.** (2015) Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *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

