

STRONGYLOIDES RATTI

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga Strongyloidosis

96 analyser på enskilda brunnar



Instruktioner för användning av artikel N° 9450

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/10285

Avsedd användning:

Bordier *Strongyloides ratti* ELISA kit är avsedd för kvantitativ bestämning av IgG klass antikroppar emot *Strongyloides* I mänskligt serum.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med ***Strongyloides ratti*** somatisk larv antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska prövningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 prövningar):

WELL	9450-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Strongyloides ratti</i> somatisk larv antigener	96	brunnar
DILB	9450-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9450-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9450-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9450-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9450-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9450-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9450-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9450-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9450-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9450-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 µl kontroll sera 9450-06 till -08 i 190 µl utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 µl serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9450-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9450-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9450-10 i utspädd buffert. 9450-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9450-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9450-02, 9450-03, 9450-04 och 9450-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9450-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9450-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9450-06 till -08) är från kaniner.

Volymer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9450-09 + utspädningsbuffert	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9450-06 till -08 + utspädningsbuffert	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9450-10 + 9450-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1 : blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 12 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9450-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av strongyloidosis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9450-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Strongyloides ratti** somatisk larv antigener är kliniskt icke signifikant. Om strongyloidosis är starkt misstänkt, andra tekniker bör provas (Baermann, fekal kultur, multipel avföring examinationer).

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9450-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Strongyloides ratti** somatisk larv antigener anses vara kliniskt signifikant. Detta resultat bör överväga korsreaktiviteter av andra parasitinfektioner (stående), de endemiska situationen och kliniska symptomen.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

En känslighet av 88 % hittades med 48 sera från patienter med larva av *strongyloides stercoralis*. En Specificitet av 94 % hittades med 100 sera av bloddonörer (swiss).

Testet av 89 sera från 2 grupper av patienter med andra parasitoser (Amebiasis, Ascariidiosis, Cysticercosis, Fasciolosis, Filariosis, Cystic echinococcosis, Schistosomosis och Toxocarosis) visade en specificitet av 77 %. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0.738	1.320	0.768	1.339
Standardavvikelse (absorbans)	0.040	0.040	0.052	0.063
Variationskoefficient (%)	5.5	3.0	6.8	4.7

Referenser:

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

