

STRONGYLOIDES RATTI

Enzymatický imunologický test pro diagnózu Strongoloidózy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro



Pokyny k použití pro produkt č. **9450**
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/10285

Zamýšlené použití:

Bordierova sada ELISA pro *Strongyloides ratti* je určena pro kvantitativní určení třídy protilátek IgG proti parazitu Strongyloides v lidském séru.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících somatické larvální antigeny **Strongyloides ratti**. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9450-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující somatické larvální antigeny Strongyloides ratti	96	destiček
DILB	9450-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9450-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9450-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9450-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9450-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9450-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9450-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9450-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9450-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9450-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 μ l kontrolního séra 9450-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9450-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9450-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9450-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9450-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9450-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9450-02, 9450-03, 9450-04 a 9450-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 9450-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9450-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9450-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9450-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9450-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtete hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 12% A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9450-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů strongyloidózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9450-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti somatickým larválním antigenům ***Strongyloides ratti*** klinicky nevýznamná. Pokud je významné podezření na strongyloidózu, doporučujeme použít další postupy (Baermann, fekální kultura, vícenásobné zkoumání stolice).

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9450-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti somatickým larválním antigenům ***Strongyloides ratti*** považována za klinicky významnou. Tento výsledek musí vzít v úvahu vzájemnou reaktivitu dalších parazitických infekcí (uvedeny níže), endemickou situaci a klinické symptomy.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost 88 % byla zjištěna u 48 sér od pacientů s larvami *strongyloides stercoralis*.

Specifita o hodnotě 94 % byla zjištěna u 100 sér dárců krve (Švýcarsko).

Test 89 sér od 2 skupin pacientů s dalšími parazitickými onemocněními (amebiáza, ascaridióza, cysticerkóza, fasciolóza, filarióza, cystická echinokokóza, schistosomóza a toxocaróza) ukázal specifitu 77 %. Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,738	1,320	0,768	1,339
Standardní odchylka (absorbance)	0,040	0,040	0,052	0,063
Koeficient odchylky (%)	5,5	3,0	6,8	4,7

Reference:

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.

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

