

Strongyloides ratti IgG ELISA

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej strongyloidózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre artikel č. 9450
Reg. zn. CE: H-CH/CA01/IVD/10285 - UDI-DI: 07640158219454



Plánované použitie:

Súprava Bordier *Strongyloides ratti* IgG ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Strongyloides* nematódom v ľudskom sére. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

Pozadie:

Strongyloidóza je spôsobená nemátodou *Strongyloides stercoralis*. Ľudia môžu byť infikovaní kontaktovaním kontaminovanej pôdy s larvami *Strongyloides*, ktoré môžu perkutánne vstúpiť do tela prostredníctvom exponovanej kože, ako sú bosé nohy. Väčšina infikovaných ľudí nevykazuje žiadne príznaky, alebo vykazujú nešpecifické príznaky, ako je bolesť brucha, nevoľnosť, hnačka, kašeľ alebo vyrážky. Avšak v niektorých prípadoch môže dôjsť k hyperinfekčnému syndrómu a diseminovanej silylloidóze u ľudí, ktorí užívajú kortikosteroidy, iné imunosupresívne terapie alebo ktorí trpia AIDS alebo inými imunodeficienciami. Diagnóza je založená na detekcii lariev parazitov v stolici a na pozitívnom výsledku sérologickým testovaním.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitizedovaných somatickými larválnymi antigénmi *Strongyloides ratti*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalického fosfatázy. Druhý premývacie krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalického fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Strongyloides ratti* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodoštičiek ELISA.

Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9450-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedované antigénmi somatickými larválnymi <i>Strongyloides ratti</i>	96	jamky
DILB	9450-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
CONTROL +	9450-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
CONJ	9450-09	Proteín A - konjugát alkalického fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
SUBS	9450-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	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), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9450-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitivované 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 vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9450-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

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 alkalickkej fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Kontrolné séra: rozriedte 10 µl kontrolných sér 9450-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Konjugát: rozriedte konjugát 9450-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

Roztok substrátu: rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9450-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9450-04 (1 tableta v 2,5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

Zastavovací roztok: použite reagent 9450-05, nezriedený.

Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladujte pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN ₃)	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9450-02	0,1%	0,02%
Premývací roztok (10 x)	9450-03	0,05%	/
Premývací roztok	9450-04	0,01%	/
Kontrolné séra (20 x)	9450-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9450-09	0,1%	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 9450-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9450-06 až -08) sú z králikov.
- Zaochádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagensmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.
- Zabráňte znehodnoteniu mikrojamek mechanickým pôsobením (špičky/kužele, dýzy).
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke www.bordier.ch.

Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

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 (vzorky bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

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 absorbcie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorpcie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorpcia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabej pozitívnej kontrolnej vzorky > 18% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 10% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: www.bordier.ch.

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. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Strongyloides ratti** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako **1,0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Strongyloides ratti** považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

V prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať potvrdzovací test (najčastejšie western blot), ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštátnymi predpismi.

Analytické výkony:

Analytická špecifickosť:

Presnosť s výškou 70 % sa zistila v 89 sérach pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa vyskytuje hlavne u pacientov so schistosomiázou, filariózami, toxokarózou, fasciolózou a amebiázou.

Pri suprafyziologických koncentráciách hemoglobínu, lipidov alebo bilirubínu v sérach doplnených interferentmi sa nepozorovala žiadna pozitívna ani negatívna interferencia.

Precíznosť:

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

Tieto výkony nemožno hodnotiť, pretože pre túto analýzu neexistuje certifikovaný referenčný materiál:

- analytická citlivosť (limity detekcie a kvantifikácie),
- presnosť,
- pravdivosť,
- rozsah merania,
- linearita.

Klinické výkony:

Diagnostická citlivosť:

Citlivosť 90 % sa zistila v 59 sérach pacientov s larvami *Strongyloides stercoralis*. Pri silnom podozrení na strongyloidózu by sa mali použiť iné techniky (Baermann, kultivácia stolice, viacnásobné vyšetrenie stolice).

Diagnostická špecifickosť:

Presnosť s výškou 96 % sa zistila v 150 sérach darcov krvi (švajčiarskych).

Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota:

Pri vyššie uvedených populáciách sa zistila PPV 90% a NPV 96%.

Očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie:

V normálnej populácii 99 švajčiarskych darcov krvi a 98 sér zo švajčiarskeho infekčného oddelenia je očakávaná hodnota indexu 0,33. V postihnutej populácii 7 sér od pacientov trpiacich strongyloidózou je očakávaná hodnota indexu 1,41.

Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

Obmedzenia:

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

Odkazy na použité literatúru:

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**.

Formenti, F., Buonfrate, D., Prandi, R., Marquez, M., Caicedo, C., Rizzi, E., Guevara, A.G., Vicuña, Y., Huerlo, F.R., Perandin, F., Bisoffi, Z. and Anselmi, M. (2016) Comparison of *S. stercoralis* Serology Performed on Dried Blood Spots and on Conventional Serum Samples. Front. Microbiol. **7**:1778.

Autier, B., Boukthir, S., Degeilh, B., Belaz, S., Dupuis, A., Chevrier, S., Gangneux, J. P. and Robert-Gangneux, F. (2021) Clinical value of serology for the diagnosis of strongyloidiasis in travelers and migrants: A 4-year retrospective study using the Bordier IVD *Strongyloides ratti* ELISA assay. Parasite **28**, 79.



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

