

Strongyloides ratti IgG ELISA

Imunološko određivanje enzima za dijagnozu ljudske strongiloidoze

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Upute za upotrebu za br. artikla 9450

Reg. Br. EZ-a: H-CH/CA01/IVD/10285 - UDI-DI: 07640158219454



Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Strongyloides ratti* IgG ELISA namijenjen je za kvantitativno prepoznavanje antitijela protiv *Strongyloides* nematoda u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda.

Pozadina:

Strongiloidozu uzrokuje nematoda *Strongyloides stercoralis*. Ljudi se mogu zaraziti pri dodiru s tlom kontaminiranim ličinkama *Strongyloides* koje perkutano mogu dospjeti u tijelo kroz izloženu kožu kao što su gola stopala. Većina zaraženih ljudi ne pokazuje nikakve simptome ili pokazuje neuobičajene znakove kao što su bol u želucu, mučnina, proljev, kašalj ili osip. Međutim, u pojedinim slučajevima, sindrom hiperinfekcije i diseminirana strongiloidoza mogu nastupiti u osoba koje su na kortikosteroidima, drugim imunosupresivnim terapijama ili koje boluju od AIDS-a ili drugih imunodeficijenција. Dijagnoza se temelji na identifikaciji ličinki parazita u stolici i uz pozitivan rezultat dobiven serološkim testiranjem.

Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziran somatskim larvalnim antigenima *Strongyloides ratti*. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Strongyloides ratti* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test se može provesti automatskim sustavima, no to mora potvrditi korisnik.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	9450-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Strongyloides ratti</i> somatski larvalni antigeni	96	jažica
DILB	9450-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
WASH	9450-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	9450-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
CONTROL -/+	9450-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
CONTROL +	9450-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
CONJ	9450-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
SUBS	9450-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet na temperaturi od 2 °C do 8 °C (transportirajte na okolnoj temperaturi), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i LOT broj kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi od 2°C do 8°C.

Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na 37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

Priprema reagensa prije upotrebe:

Osigurajte da svi reagensi budu na sobnoj temperaturi i pomiješajte ih prije upotrebe.

Jažice ELISA: otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9450-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

Pufer za razrjeđivanje: razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9450-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Otopina za ispiranje: razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9450-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Kontrolni serumi: razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9450-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi od 2°C do 8°C.

Konjugat: razrijedite konjugat 9450-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

Otopina supstrata: otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9450-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9450-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

Otopina za zaustavljanje: upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9450-05.

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum se treba čuvati na temperaturi od 2°C do 8°C ako će se analizirati unutar nekoliko dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje. Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml).

Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N _a N ₃)	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	9450-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	9450-03	0,05%	/
Enzimski pufer	9450-04	0,01%	/
Kontrolni serumi (20 x)	9450-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9450-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

- Otopina za zaustavljanje 9450-05 (0,5 M K₃PO₄) ima nadražujuć učinak.
- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9450-06 do -08) potječu od kunića.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense ni različite LOT brojeve kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.
- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu www.bordier.ch.

Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

1. korak: Blokiranje:

U cijelosti napunite jažice otopinom pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 – 15 minuta na sobnoj temperaturi (blokiranje).

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na 37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

5. korak: Mjerenje apsorcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 18% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 10% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

Kontrole kvalitete trenutačnih LOT brojeva objavljene su na našem web-mjestu www.bordier.ch.

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9450-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva strongiloidoze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **1,0**. U ovom je slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena **Strongyloides ratti** klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka viši od **1,0**. U ovom se slučaju koncentracija antitijela IgG protiv antigena **Strongyloides ratti** smatra klinički značajnom. To označava da je bolesnik bio u dodiru s parazitom.

Svaki laboratorij može definirati sivu zonu u skladu sa svojom bolesničkom populacijom. U slučaju graničnih ili sumnjivih rezultata preporučujemo ponavljanje testa nakon 2 - 4 tjedna upotrebom svježeg uzorka.

U slučaju sumnjiva rezultata preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

Analitički rezultati:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 70 % pronađena je u 89 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija. Unakrižna reaktivnost poglavito nastupa kod bolesnika sa shistosomijazom, filarijazom, toksokarozom, fasciolijazom i amebijazom.

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

Preciznost:

Ponovljivost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 10 različitih testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjek (apsorpcija)	0,738	1,320	0,768	1,339
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,040	0,040	0,052	0,063
Koeficijent varijacije (%)	5,5	3,0	6,8	4,7

Sljedeći rezultati ne mogu se procijeniti jer ne postoji potvrđeni referentni materijal za tu analizu:

- analitička osjetljivost (ograničenja prepoznavanja i kvantizacije)
- točnost
- istinitost
- mjerni raspon
- linearnost.

Klinički rezultati:

Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 90 % pronađena je u 59 seruma od bolesnika s ličinkama *Strongyloides stercoralis*. Ako se snažno sumnja na strongiloidozu, potrebno je provesti ostale tehnike (Baermann, fekalna kultura, višestruke pretrage stolice).

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 96 % pronađena je u 150 seruma (švicarskih) darivatelja krvi.

Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 90% i NPV od 96% pronađene su u spomenutim populacijama.

Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 99 švicarskih darivatelja krvi i 98 seruma iz švicarske infektološke jedinice, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,33. U pogođenoj populaciji od 7 seruma od bolesnika koji boluju od strongiloidoze, očekivana indeksna vrijednost iznosi 1,41.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

Reference:

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, Švicarska.

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

