

# Strongyloides ratti IgG ELISA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu strongyloidózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití



Návod k použití pro produkt č. 9450  
EC reg. č.: H-CH/CA01/IVD/10285 - UDI-DI: 07640158219454



## Předpokládané použití:

Sada *Strongyloides ratti* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti hádčátkům *Strongyloides* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

## Pozadí:

Strongyloidóza je způsobena hlísticí hádč střešní - *Strongyloides stercoralis*. Lidé se mohou nakazit kontaktem se zemí kontaminovanou larvami *Strongyloides*, které vstupují do těla obnaženou pokožkou, například bosými chodidly. Většina nakažených lidí nevykazuje žádné symptomy nebo projevuje nespecifické znaky jako bolení žaludku, nevolnost, průjem, kašel nebo vyrážka. Avšak v některých případech se může u lidí, kteří jsou léčeni kortikosteroidy, jinou imunosupresivní léčbou nebo kteří trpí AIDS nebo jiným imunitním onemocněním, projevit hyperinfekční syndrom a roztroušená strongyloidóza. Diagnóza je založena na detekci larev parazita ve stolici a pozitivním výsledku sérologického testu.

## Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících somatické larvální antigeny *Strongyloides ratti*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Strongyloides ratti* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

## Materiály obsažené v sadě (96 testů):

<b>WELL</b>	9450-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující somatické larvální antigeny <i>Strongyloides ratti</i>	96	destiček
<b>DILB</b>	9450-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	50	ml
<b>WASH</b>	9450-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9450-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9450-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9450-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
<b>CONTROL +/-</b>	9450-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9450-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
<b>CONJ</b>	9450-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
<b>SUBS</b>	9450-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

## Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejich součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

## Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μl). 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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

## Příprava činidel před použitím:

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

**Destičky ELISA:** Otevřete bok hliníkové tašky 9450-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

**Tlumicí roztok na ředění:** Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9450-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Vyplachovací roztok:** Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Kontrolní sérum:** Zředte 10 µl kontrolního séra 9450-06 až -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Konjugát:** Zředte konjugát 9450-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

**Roztok substrátu:** rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9450-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9450-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředěte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

**Zastavovací roztok:** Použijte neředěné činidlo 9450-05.

## Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředěte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

## Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9450-02	0,1%	0,02%
Vyplachovací roztok (10 x)	9450-03	0,05%	/
Tlumicí enzym	9450-04	0,01%	/
Kontrolní sérum (20 x)	9450-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	9450-09	0,1%	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 9450-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9450-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikroděstičky opakovaně.
- Zabraňte poškození mikrojamek mechanickým působením (špičky/kužele, trysky).
- Popisy symbolů použitých na etiketách naleznete na webových stránkách [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).
- 

## Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

## Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

### 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 zaklepaním s proužky nad výlevkou.

### Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (vzorku bez séra).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

### Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky vzorku bez séra).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

### Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

### Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, oťřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

## Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček vzorku bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A slabě pozitivního kontrolního vzorku > 18% A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 10% A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9450-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů strongyloidózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než **1,0**. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Strongyloides ratti** klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než **1,0**. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenu **Strongyloides ratti** považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

V případě pozitivního nebo nejasného výsledku doporučujeme provést potvrzovací test (nejčastěji metodou Western blot), pokud je takový test k dispozici nebo ho vyžadují vnitrostátní předpisy.

## Analytické výkony:

### Analytická specifičnost:

Specifita 70% byla zjištěna u 89 sér pacientů s jinými parazitárními infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů se schistosomózou, filariózami, toxokarózou, fasciolózou a amébozou.

U suprafyziologických koncentrací hemoglobinu, lipidů nebo bilirubinu v séru doplněných interferenty nebyla pozorována žádná pozitivní ani negativní interference.

### Přesnost:

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
<b>Průměr (absorbance)</b>	0,738	1,320	0,768	1,339
<b>Standardní odchylka (absorbance)</b>	0,040	0,040	0,052	0,063
<b>Koeficient odchylky (%)</b>	5,5	3,0	6,8	4,7

Následující hodnoty nelze stanovit, protože pro tuto analýzu není k dispozici žádný certifikovaný referenční materiál:

- Analytická citlivost (meze detekce a kvantifikace)
- Přesnost
- Pravdivost
- Rozsah měření
- Linearita

## Klinické výkony:

### Diagnostická citlivost:

Citlivost 90% byla zjištěna u 59 sér pacientů s larvami *Strongyloides stercoralis*. Existuje-li silné podezření na strongyloidózu, měly by být použity jiné metody (Baermann, fekální kultura, vícenásobné zkoumání stolice).

### Diagnostická specifičnost:

Specifita 96% byla zjištěna u 150 sér dárců krve (Švýcarsko).

### Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedených populací byly zjištěny hodnoty PPV 90% a NPV 96%.

### Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 99 švýcarských dárců krve a v 98 sérech ze švýcarského infekčního oddělení činí očekávaná hodnota indexu 0,33. V zasažené populaci 7 sér pacientů trpících strongyloidózou činí očekávaná hodnota indexu 1,41.

### Incidenty:

Každý závažný incident, k němuž v souvislosti s tímto prostředkem dojde, je nutné oznámit výrobcí a příslušnému orgánu členského státu, v němž je uživatel anebo pacient usazen.

### Omezení:

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

### 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, Switzerland.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

