

STRONGYLOIDES RATTI

Test immunoenzimatico per la diagnostica della strongiloidosi umana

96 tests su astine separabili destinati ad uso **in vitro**

Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9450
N° CE: H-CH/CA01/IVD/10285



Usò previsto del prodotto:

Il kit *Strongyloides ratti* ELISA è previsto per la determinazione quantitativa degli anticorpi IgG contro *Strongyloides* nel siero umano.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti sensibilizzati con antigeni somatici di larve di ***Strongyloides ratti***. La presenza di anticorpi sierici specifici rispetto agli antigeni parassitari è evidenziata mediante un coniugato proteina A-fosfatasi alcalina. I pozzetti sono suddivisi in astine separabili, che permettono di testare economicamente piccole serie di campioni.

Materiale contenuto nel kit (96 tests):

WELL	9450-01	Pozzetti sensibilizzati con antigeni somatici di larve di <i>Strongyloides ratti</i> , su astine separabili	96	pozzetti
DILB	9450-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x)	50	ml
WASH	9450-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9450-04	Tampone dell' enzima	50	ml
STOP	9450-05	Soluzione d'arresto (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9450-06	Siero di controllo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9450-07	Siero di controllo debamente positivo (soglia)	200	µl
CONTROL +	9450-08	Siero di controllo positivo	200	µl
CONJ	9450-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina	300	µl
SUBS	9450-10	Substrato della fosfatasi	20	Compress e
		Riserva di reattivi per multipipette, 25 ml	1	Pezzo
		Quadro di sostegno per il contenitore dei pozzetti	1	Quadro

Conservazione:

Conservare il kit tra 2° e 8° C (trasporto a temperatura ambiente). La data di scadenza e il numero del lotto sono stampati sul lato della scatola.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (μl e ml). Recipienti. Provette per la diluizione dei sieri. Bande adesive per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C . Lettore ELISA tarato ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9450-01 e prendere il numero necessario di pozzetti. Mettere i pozzetti in un supporto. Se necessario, completare le posizioni non utilizzate del supporto con dei pozzetti già usati. Mettere il supporto in un quadro rispettando il suo orientamento. Conservare le astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9450-02, 1/10 in acqua distillata.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9450-03, 1/10 in acqua distillata. Se volete utilizzare la vostra soluzione di lavaggio, evitate i tamponi che contengono fosfato e che potrebbero inibire successivamente l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina.

Sieri di controllo negativi, debolmente positivi (soglia) e positivi: diluire 10 μl di ogni siero di controllo 9450-06 a -08 in 190 μl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20).

Sieri da testare: diluire 10 μl di siero in 2.0 ml della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/201).

Coniugato proteina A - fosfatasi alcalina: diluire il coniugato 9450-09, 1/51 nella soluzione tampone di diluizione.

Soluzione di substrato: equilibrare a temperatura ambiente il tampone dell'enzima 9450-04. Prima di aggiungere ai pozzetti ELISA il substrato della fosfatasi dissolvere il numero necessario di compresse di substrato 9450-10 nel tampone dell'enzima 9450-04 non diluito (una compressa in 2.5 ml di tampone). Vortexare fino a scioglimento completo della compressa.

Soluzione d'arresto: utilizzare il reagente N° 9450-05 non diluito.



Precauzioni d'uso: Le soluzioni 9450-02, 9450-03, 9450-04 e 9450-09 contengono rispettivamente 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.1% di azoturo di sodio (NaN_3). La soluzione 9450-02 contiene 0.02% di merthiolato. Queste sostanze sono tossiche. La soluzione d'arresto 9450-05 (0.5 M K_3PO_4) è irritante.

I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (9450-06 a -08) provengono da conigli.

Volumi da preparare:

			Numero di pozzetti da utilizzare			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampone di diluizione (10 x)	9450-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. di lavaggio (10 x)	9450-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Coniugato	9450-09 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sieri di controllo	9450-06 a -08 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sieri da testare	Siero + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Soluzione di substrato	9450-10 + 9450-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Metodo:

Tappa 1: Bloccaggio:

Riempire completamente i pozzetti con la soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti a temperatura ambiente (bloccaggio dei pozzetti).

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le astine sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con i campioni di siero:

Riempire il primo pozzetto della prima astina con 100 µl di tampone di diluizione ("bianco", senza siero).

Riempire i tre pozzetti seguenti con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo).

Riempire gli altri pozzetti con i sieri da testare diluiti (100 µl)

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare i sieri e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 3: Incubazione con il coniugato:

Distribuire 100 µl del coniugato proteina A - fosfatasi diluito in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 4: Incubazione con il substrato:

Distribuire 100 µl della soluzione di substrato in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Arrestare la reazione aggiungendo a ogni pozzetto 100 µl della soluzione d'arresto.

Tappa 5: Misura della densità ottica:

Asciugare sotto i pozzetti, eliminare le eventuali bolle d'aria e misurare la densità ottica (Assorbimento) alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del "bianco" in assenza di siero da tutti gli altri valori. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti : DO del controllo positivo >1.200, DO del controllo negativo < 12% del controllo positivo, DO del "bianco" misurato contro l'aria < 0.350.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9450-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di strongiloidosi e i sieri di soggetti sani.

Il risultato è **negativo** quando la densità ottica del siero da testare è più bassa di quella del siero soglia 9450-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni somatici di larve di ***Strongyloides ratti*** non è significativa clinicamente. In caso di forte sospetto clinico di strongiloidosi, è opportuno eseguire anche tecniche per la ricerca dei parassiti nelle feci (esame microscopico di multipli campioni fecali, Baermann, coprocoltura).

Il risultato è **positivo** quando la densità ottica del siero da testare è più alta di quella del siero soglia 9450-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni somatici di larve di ***Strongyloides ratti*** è considerata clinicamente significativa. Questo risultato orienta verso una strongiloidosi. Dev' essere interpretato tenendo conto della possibilità di eventuali reazioni crociate con le parassitosi citate qui sotto e a seconda del contesto clinico ed epidemiologico.

Sensibilità e specificità del test:

Una sensibilità dell' 88 % è stata osservata con 48 sieri provenienti da pazienti che presentavano una strongiloidosi confermata dalla presenza di larve nelle feci. Una specificità del 94 % è stata osservata con 100 sieri di donatori di sangue (svizzeri). Una specificità del 77 % è stata osservata con 89 sieri provenienti da 2 gruppi di pazienti affetti da altre parassitosi (amebiasi, ascaridiosi, bilarziosi, cisticercosi, distomatosi, filariosi, idatidiosi e toxocarasi). Uno studio interno ha mostrato che i sieri lipemici, itterici o emolisati non presentano problemi per la realizzazione di questo test.

La ripetibilità è stata valutata testando 2 sieri umani in 24 pozzetti di una micropiastra in un unico test. La riproducibilità è stata valutata testando questi 2 campioni in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
Media (densità ottica)	0.738	1.320	0.768	1.339
Deviazione-standard (densità ottica)	0.040	0.040	0.052	0.063
Coefficiente di variazione (%)	5.5	3.0	6.8	4.7

Riferimenti bibliografici:

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
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

