

SCHISTOSOMA MANSONI

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de la bilharziose humaine

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage in vitro

Instructions d'utilisation pour l'article N° 9600
N° CE: H-CH/CA01/IVD/17983



Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique (IgG) de la bilharziose chez les patients ayant séjournés dans des zones d'endémies avec des bains en eau douce, surtout durant la phase invasive lorsque le diagnostic parasitologique de la maladie est difficile. Enquête chez les compagnons de voyage de sujets atteints de bilharziose et études épidémiologiques dans les zones d'endémies. Contrôle post thérapeutique.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec des antigènes solubles de *Schistosoma mansoni*. La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis des antigènes parasitaires est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	9600-01	Barrettes sécables sensibilisées avec les antigènes solubles de <i>Schistosoma mansoni</i>	96	puits
DILB	9600-02	Tampon de dilution (concentré 10 x)	50	ml
WASH	9600-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	9600-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	9600-05	Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
CONTROL -/+	9600-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
CONTROL +	9600-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
CONJ	9600-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline	300	µl
SUBS	9600-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8° C (transport à température ambiante). La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

Equipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37° C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 9600-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

Tampon de dilution: diluer le tampon de dilution concentré 10 x 9600-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 9600-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Sérums de contrôles négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10 μl de chaque sérum de contrôle 9600-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/20).

Sérums à tester: diluer 10 μl de sérum dans 2.0 ml de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/201).

Conjugué protéine A – phosphatase alcaline: diluer le conjugué 9600-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 9600-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 9600-10 dans le tampon de l'enzyme 9600-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 9600-05 non dilué.



Précautions d'utilisation: Les solutions 9600-02, 9600-03, 9600-04 et 9600-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (N_3Na). La solution 9600-2 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 9600-5 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (9600-06 à -08) proviennent de lapins.

Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampon de dilution (10 x)	9600-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavage (10 x)	9600-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugué	9600-09 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sérums de contrôles	9600-06 à -08 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sérums à tester	Sérum + tampon de dilution	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solution de substrat	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Méthode:

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution de tampon de dilution.

Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes en dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc en absence de sérum).

Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).

Remplir les autres puits avec les sérums à tester dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué protéine A - phosphatase dilué dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc en absence de sérum de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis : DO contrôle positif >1.200, DO contrôle négatif < 8% du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 9600-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques de bilharziose et les sérums de sujets sains.

Le résultat est **négatif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus basse que celle du sérum seuil 9600-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Schistosoma mansoni* n'est pas cliniquement significative.

Le résultat est **positif** lorsque la densité optique du sérum à tester est plus élevée que celle du sérum seuil 9600-07. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes solubles de *Schistosoma mansoni* est considérée comme cliniquement significative. Ce résultat oriente vers une bilharziose. Il doit être interprété en tenant compte de la possibilité d'éventuelles réactions croisées avec les parasitoses citées ci dessous et selon les données anamnestiques.

Sensibilité et spécificité du test:

Le test détecte également les patients infectés par *Schistosoma haematobium*.

Une **sensibilité** de **94%** a été observée avec 80 sérums provenant de patients présentant une bilharziose confirmée parasitologiquement (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* et 2/3 infection mixte) ou présentant une sérologie positive spécifique en western-blot (13/13).

Une **spécificité** de **99 %** a été observée avec 122 sérums de donneurs de sang (Suisses).

Une **spécificité** de **94%** a été observée avec 141 sérums provenant de groupes de patients atteints d'autres parasitoses. Amibiase (0/8), anguillulose (0/13) cysticerose (0/3), distomatose (0/5), filariose (3/21), hydatidose (1/27), leishmaniose (3/11), trichinellose (1/9), toxocarose (0/5), toxoplasmose (1/20) et paludisme (0/19),.

Une étude interne a montré que les sérums lipémiques, ictériques ou hémolysés ne présentaient pas de problèmes pour la réalisation de ce test.

La répétabilité a été évalué en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évalué en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.412	1.249	0.407	1.246
Ecart-type (densité optique)	0.031	0.067	0.029	0.076
Coefficient de variation (%)	7.6	5.3	7.1	6.1

References:

Doenhoff, M.J., Wheeler, J.G., Tricker, K., Hamilton, J.V., Sturrock, R.F., Butterworth, A.E., Ouma, J.H., Mbugua, G., Kariuki, C. and Koech, D. (2003) The detection of antibodies against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens (SEA) and CEF6 in ELISA, before and after chemotherapy. Ann Trop Med Parasitol. **97**:697-709.

Turner, P., Lalloo, K., Bligh, J., Armstrong, M., Whitty, C.J.M., Doenhoff, M.J. and Chiodini, P.L. (2004) Serological speciation of human schistosome infections by ELISA with a panel of three antigens. J Clin Pathol. **57** :1193-1196.

Sorgho, H., Bahgat, M., Poda, J., Song, W., Kristen, C., Doenhoff, M.J., Zongo, I., Ouédraogo, J. and Ruppel, A. (2005) Serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infections in endemic area of Burkina Faso : performance of several immunological tests with different parasite antigens. Acta Tropica. **93** : 169-180.

Houzé, S., Genoux, F., Eisélé, L., Hance, P., Vaslin, L. and Le Bras, J. (2007) Evaluation of a novel Elisa for schistosomiasis serology. Physiopathology of intracellular parasitic diseases at the 1st three countries joint meeting (French, German and Swiss). Strasbourg.



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

