

SCHISTOSOMA MANSONI

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Schistosomiasis

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9600**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/17983



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) von Schistosomiasis, speziell während der invasiven Phase, wenn wenige oder keine Eier ausgeschieden werden. Nachweis spezifischer Antikörper bei Reisenden, die aus endemischen Gebieten zurückkehren und häufigen Kontakt mit Frischwasser hatten. Nachweis bei Reisebegleitern von bestätigten Fällen. Kontrollprogramm in endemischen Gebieten. Posttherapeutische Kontrolle.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit **Schistosoma mansoni** lösliches Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenreihen ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9600-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit Schistosoma mansoni lösliches Antigen	96	Wells
DILB	9600-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9600-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9600-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9600-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9600-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9600-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9600-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9600-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

51005_01 9600 Deu 02.2016

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9600-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9600-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9600-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9600-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9600-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9600-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9600-10 im Puffer 9600-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9600-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9600-02, 9600-03, 9600-04 und 9600-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9600-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9600-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9600-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9600-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9600-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9600-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9600-10 + 9600-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 8 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9600-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Schistosomiasis und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9600-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Schistosoma mansoni** lösliches Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9600-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Schistosoma mansoni** lösliches-Antigen als signifikant angesehen. Die Interpretation des Resultats sollte die Kreuzreaktivität anderer parasitärer Infektionen (unten genannt), die klinischen Symptome und die endemische Situation mit einbeziehen.

Sensitivität und Spezifität:

Der Test erkennt auch *Schistosoma haematobium*-infizierte Patienten. Eine Sensitivität von 94% wurde bei einer Gruppe von 80 Seren von Patienten mit parasitologisch nachgewiesener Schistosomiasis (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* und 2/3 Mischinfektionen) oder positiver spezifischer Serologie im Westernblot(13/13) gezeigt. Eine Spezifität von 99% wurde mit 122 Seren von Blutspendern (Schweiz) gefunden. Der Test mit anderen parasitären Infektionen zeigte eine Spezifität von 94%.

Amöbiose (0/8), Zystizerkose (0/3), Fasziole (0/5), Filariose (3/21), zystischer Echinokokkose (1/27), Leishmaniose (3/11), Strongyloidosis (0/13), Trichinellose (1/9), Toxocariasis (0/5), Toxoplasmose (1/20) und Malaria (0/19). Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0.412	1.249	0.407	1.246
Standardabweichung (A Wert)	0.031	0.067	0.029	0.076
Variationskoeffizient (%)	7.6	5.3	7.1	6.1

Referenzen:

Doenhoff, M.J., Wheeler, J.G., Tricker, K., Hamilton, J.V., Sturrock, R.F., Butterworth, A.E., Ouma, J.H., Mbugua, G.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., 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., 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., Eiselé, 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

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

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

