

SCHISTOSOMA MANSONI

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση Σχιστοσωμίας σε άνθρωπο

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια

Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. 9600
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: H-CH/CA01/IVD/17983



Προβλεπόμενη χρήση:

Ορολογική διάγνωση (IgG) σχιστοσωμίας, ειδικά κατά τη διάρκεια της επεμβατικής φάσης, όταν απεκκρίνονται λίγα ή καθόλου αυγά, με ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε ταξιδιώτες που επιστρέφουν από ενδημικές περιοχές, με συχνή επαφή με γλυκό νερό. Διαλογή συνταξιδιωτών επιβεβαιωμένων κρουσμάτων. Προγράμματα ελέγχου σε ενδημικές περιοχές. Μεταθεραπευτικοί έλεγχοι.

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε υποδοχές μικροτιτλοδότησης ευαισθητοποιημένες με διαλυτά αντιγόνα **Schistosoma mansoni**. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ευαισθητοποιημένες υποδοχές παρέχονται ως εύθραυστες ταινίες για την οικονομική δοκιμή μικρών σειρών δειγμάτων.

Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές)

WELL	9600-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με διαλυτά αντιγόνα Schistosoma mansoni	96	φρεάτια
DILB	9600-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
WASH	9600-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
ENZB	9600-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
STOP	9600-05	Ανασχετικό διάλυμα (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONTROL -/+	9600-07	Ασθενής θετικός ορός (διακοπή)	200	μl
CONTROL +	9600-08	Θετικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONJ	9600-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης	300	μl
SUBS	9600-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης	20	δισκία
		Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml	1	τεμάχιο
		Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	1	τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8° C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού.

Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και μ l). Φιάλες. Σωλήνες για την αραιώση του ορού. Κολητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37° C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9600-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται. Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9600-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα πλύσης: αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9600-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Αρνητικός, ασθενής θετικός (διακοπή) και θετικός **ορός μάρτυρα:** αραιώστε 10 μ l ορού μάρτυρα 9600-06 έως -08 σε 190 μ l ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/20).

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 μ l ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201).

Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης: αραιώστε σύζευγμα 9600-09, σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/51).

Διάλυμα υποστρώματος: προθερμάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9600-04 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν την προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια ELISA, διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9600-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 9600-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων).

Ανασχητικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9600-05 μη αραιωμένο.



Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα: Τα διαλύματα 9600-02, 9600-03, 9600-04 και 9600-09 περιέχουν αντίστοιχα 0,1%, 0,05%, 0,01% και 0,1% αζίδιο του νατρίου (NaN_3). Το διάλυμα 9600-02 περιέχει 0,02% μερθειολικού. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές. Το ανασχητικό διάλυμα 9600-05 (0,5 M K_3PO_4) είναι ερεθιστικό.

Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9600-06 έως -08) είναι από κουνέλια.

Όγκοι προς προετοιμασία:

			Συνολικός αριθμός φρεατίων προς χρήση			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)	9600-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9600-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Σύζευγμα	9600-09 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Ορός μάρτυρα	9600-06 έως -08 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Οροί προς δοκιμή	Ορός + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Διάλυμα υποστρώματος	9600-10 + 9600-04	δισκ. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Διαδικασία:

Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης.

Επώαστε για 5 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικό, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα (100 μl το καθένα).

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τους αραιωμένους ορούς προς δοκιμή (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης σε κάθε φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 4: Επώαστε με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων, εξαλείψτε τις φυσαλίδες και μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm.

Ερμηνεία

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200, A του αρνητικού μάρτυρα < 8% του A του θετικού μάρτυρα, A κενό έναντι αέρα < 0,350.

Η συγκέντρωση αντισωμάτων του ασθενούς θετικού (διακοπή) ορού 9600-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλτιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις σχιστοσωμίας και υγιείς ανθρώπινους ορούς.

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9600-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων **Schistosoma mansoni** είναι κλινικώς μη σημαντική.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού μάρτυρα 9600-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων **Schistosoma mansoni** θεωρείται κλινικώς σημαντική. Η ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τις διασταυρούμενες αντιδράσεις άλλων παρασιτικών λοιμώξεων (αναφέρονται κατωτέρω), τα κλινικά συμπτώματα και την ενδημική κατάσταση.

Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Η δοκιμή ανιχνεύει επίσης ασθενείς που έχουν μολυνθεί με *Schistosoma haematobium*.

Εντοπίστηκε **ευαισθησία 94%** με 80 ορούς από ασθενείς με παρασιτολογικά αποδεδειγμένη σχιστοσωμίαση (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* και 2/3 μικτές λοιμώξεις) ή θετικές ειδικές ορολογικές εξετάσεις σε μέθοδο western-blot (13/13).

Εντοπίστηκε **εξειδίκευση 99 %** με 122 ορούς αιμοδοτών (Ελβετικοί).

Η εξέταση 141 ασθενών με άλλες παρασιτικές λοιμώξεις έδειξε **εξειδίκευση 94%**. Αμοιβάδωση (0/8), κυστικέρκωση (0/3), φασιολίαση (0/5), φιλαρίαση (3/21), υδατίδωση (1/27), λεισμανίαση (3/11), ερμψυστική μυΐαση (0/13), τριχινέλλωση (1/9), τοξοκαρίαση (0/5), τοξοπλάσμωση (1/20) και ελονοσία (0/19).

Η εσωτερική αξιολόγηση έδειξε ότι αιμορραγικοί, λιπαιμικοί και ικτερικοί οροί δεν παρεμβαίνουν με τα αποτελέσματα της δοκιμής.

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή.

Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (απορρόφηση)	0,412	1,249	0,407	1,246
Τυπική απόκλιση (απορρόφηση)	0,031	0,067	0,029	0,076
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	7,6	5,3	7,1	6,1

Αναφορές:

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., Laloo, 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., 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

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

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

