

# SCHISTOSOMA MANSONI

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de esquistossomose humana

96 ensaios em poços individuais

Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9600  
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/17983



## Utilização prevista:

Diagnóstico serológico (IgG) de esquistossomose, especialmente durante a fase invasiva em que são excretados poucos ou nenhuns ovos, por deteção de anticorpos específicos em viajantes de regresso de áreas endémicas, com contacto frequente com água doce. Triagem de companheiros de viagem de casos confirmados. Programas de controlo em áreas endémicas. Controlos pós-terapêuticos.

## Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em poços de microplaca sensibilizados com antígenos solúveis de **Schistosoma mansoni**. A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

## Material incluído no kit (96 ensaios):

<b>WELL</b>	9600-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com Antígenos solúveis de <b>Schistosoma mansoni</b>	96	poços
<b>DILB</b>	9600-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9600-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9600-04	Tampão da enzima	50	ml
<b>STOP</b>	9600-05	Solução de paragem (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9600-06	Soro de controlo negativo	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	9600-07	Soro fracamente positivo (cut off)	200	µl
<b>CONTROL +</b>	9600-08	Soro de controlo positivo	200	µl
<b>CONJ</b>	9600-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina	300	µl
<b>SUBS</b>	9600-10	Substrato de fosfatase	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

## Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

## Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e  $\mu$ l). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

## Preparação de reagentes antes da sua utilização:

**Poços ELISA:** abrir a parte lateral do saco de alumínio 9600-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

**Tampão de diluição:** diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9600-02, 1/10 em água destilada.

**Solução de lavagem:** diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9600-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

**Soros de controlo** negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10  $\mu$ l de soros de controlo 9600-06 a -08 em 190  $\mu$ l de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

**Soros a testar:** diluir 10  $\mu$ l de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

**Conjugado** de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 9600-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

**Solução de substrato:** pré aquecer o tampão da enzima 9600-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9600-10 em tampão não diluído 9600-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

**Solução de paragem:** utilizar reagente 9600-05 não diluído.



**Advertências e precauções:** as soluções 9600-02, 9600-03, 9600-04 e 9600-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio ( $N_3Na$ ). A solução 9600-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 9600-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9600-06 a -08) são de coelhos.

## Volumes a preparar:

			Quantidade total de poços a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Tampão de diluição (10 x)</b>	9600-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Solução de lavagem (10 x)</b>	9600-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Conjugado</b>	9600-09 + tampão de diluição	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Soros de controlo</b>	9600-06 a -08 + tampão de diluição	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Soros a testar</b>	Soro + tampão de diluição	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Solução de substrato</b>	9600-10 + 9600-04	past. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## **Procedimento:**

### **Passo 1: bloqueio:**

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

### **Passo 2: incubação com amostras séricas:**

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 3: incubação com conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 4: incubação com substrato:**

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

### **Passo 5: medição das absorvâncias:**

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

## Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 8 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9600-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de esquistossomose e soros humanos saudáveis.

O resultado é **negativo** quando a absorvância da amostra analisada é inferior à absorvância do soro fracamente positivo 9600-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Schistosoma mansoni* é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando a absorvância da amostra analisada é superior à absorvância do controlo fracamente positivo 9600-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Schistosoma mansoni* é considerada clinicamente significativa. A interpretação deste resultado deve ter em consideração as reatividades cruzadas de outras infeções parasitárias (mencionadas a seguir), os sintomas clínicos e a situação endémica.

## Sensibilidade e especificidade do ensaio:

O teste deteta também doentes infetados com *Schistosoma haematobium*.

Foi detetada uma **sensibilidade** de **94%** com 80 soros de doentes com esquistossomose comprovada a nível parasitológico (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* e 2/3 infeções mistas) ou serologia específica positiva em western-blot (13/13).

Foi detetada uma **especificidade** de **99%** com 122 soros de dadores de sangue (suíços).

O teste de 141 doentes com outras infeções parasitárias mostrou uma **especificidade** de **94%**. Amebíase (0/8), cisticercose (0/3), fasciolíase (0/5), filariose (3/21), hidatidose (1/27), leishmaniose (3/11), estrombiloidíase (0/13), triquinelose (1/9), toxocaríase (0/5), toxoplasmose (1/20) e malária (0/19). A avaliação interna realizada mostrou que soros hemolisados, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio.

A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
<b>Média (absorvância)</b>	0,412	1,249	0,407	1,246
<b>Desvio padrão (absorvância)</b>	0,031	0,067	0,029	0,076
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	7,6	5,3	7,1	6,1

## Referências:

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 1<sup>st</sup> three countries joint meeting (French, German and Swiss). Strasbourg.



**BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA**  
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.  
Tel.: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

