

SCHISTOSOMA MANSONI

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej schistosomiázy

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. 9600
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/17983



Plánované použitie:

Sérologická diagnóza (IgG) schistosomiázy, najmä počas invazívnej fázy, keď je vylučovaných málo vajíčok alebo nie sú vylučované žiadne, detekciou špecifických protilátok u cestovateľov vracajúcich sa z endemických oblastí, kde často prišli do kontaktu s čerstvou vodou. Kontrola spolucestovateľov pri potvrdených prípadoch. Kontrolné programy v endemických oblastiach. Post-terapeutické kontroly.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitizedovaných rozpustnými antigénmi **Schistosoma mansoni**. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalickéj fosfatázy. Senzitizedované platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9600-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedované rozpustnými antigénmi Schistosoma mansoni	96	jamky
DILB	9600-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	9600-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9600-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9600-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
CONTROL -/+	9600-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
CONTROL +	9600-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
CONJ	9600-09	Proteín A – konjugát alkalickéj fosfatázy	300	µl
SUBS	9600-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μ l). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9600-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysúšacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9600-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9600-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μ l kontrolných sér 9600-06 až -08 v 190 μ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μ l séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 9600-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 9600-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9600-10 v neriedenom tlmivom roztoku 9600-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 9600-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 9600-02, 9600-03, 9600-04 a 9600-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 9600-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 9600-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9600-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	9600-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9600-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9600-09 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9600-06 až -08 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 8 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9600-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov schistosomiázy a zdravým ľudským sérom.

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbancia analyzovanej vzorky nižšia než absorbancia slabého pozitívneho séra 9600-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti rozpustným antigénom ***Schistosoma mansoni*** klinicky zanedbateľná.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbancia analyzovanej vzorky vyššia než absorbancia slabého pozitívneho séra 9600-07. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom rozpustným antigénom ***Schistosoma mansoni*** považovaná za klinicky významnú. Pri vyhodnotení výsledku tohto testu treba zohľadniť skříženú reaktivitu iných parazitických infekcií (uvedené nižšie), endemickú situáciu a klinické symptómy.

Citlivosť a presnosť testu:

Tento test vie tiež rozpoznať pacientov infikovaných *Schistosoma haematobium*.

Diagnostická **citlivosť 94 %** bola spozorovaná pri 80 sérach pacientov s parazitologicky potvrdenou schistosomiázou (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* a 2/3 zmiešané infekcie) alebo pri pozitívnej sérológií pomocou Western Blot.

Presnosť vo výške **99 %** bola spozorovaná pri 122 sérach darcov krvi (švajčiarskych).

Test 141 pacientov s inými parazitárnymi infekciami preukázal **presnosť** vo výške **94%** - amebióza (0/8), cysticerkóza (0/3), fasciolóza (0/5), filarióza (3/21), hydatidóza (1/27), leishmanióza (3/11), strongyloidóza (0/13), trichinelóza (1/9), toxokaróza (0/5), toxoplazmóza (1/20) a malária (0/19).

Vnútorne zhodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické, či ikterické séra nemajú rušivý vplyv na výsledky testu.

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.412	1.249	0.407	1.246
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.031	0.067	0.029	0.076
Variačný koeficient (%)	7.6	5.3	7.1	6.1

Odkazy na použitú literatúru:

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., 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

