

# 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):

<b>WELL</b>	9600-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitizedované rozpustnými antigénmi <b>Schistosoma mansoni</b>	96	jamky
<b>DILB</b>	9600-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9600-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9600-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9600-05	Zastavovací roztok (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b>   -	9600-06	Negatívne kontrolné sérum	200	µl
<b>CONTROL</b>   -/+	9600-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	µl
<b>CONTROL</b>   +	9600-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	µl
<b>CONJ</b>	9600-09	Proteín A – konjugát alkalickéj fosfatázy	300	µl
<b>SUBS</b>	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  $\mu$ 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  $\mu$ l kontrolných sér 9600-06 až -08 v 190  $\mu$ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

**Séra, ktoré budú testované:** rozriedte 10  $\mu$ 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 <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	9600-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9600-09 + tlmivý roztok	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	9600-06 až -08 + tlmivý roztok	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	$\mu$ l + $\mu$ 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 skríženú 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 sérológii 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 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.

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

