

SCHISTOSOMA MANSONI

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus šistosomiazėi nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9600

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/17983

Naudojimo paskirtis:

Serologinei šistosomiazės diagnozei (IgG), ypač invazinės fazės metu, kai tik keli ar nė vienas kiaušinėlis nėra išskiriamas, nustatant specifinius antikūnus keliautojams, grįžusiems iš endeminių zonų ir dažnai kontaktavusiems su šviežiu vandeniu. Kelionės draugų, kai kažkam po kelionės buvo patvirtintas ligos atvejis tikrinimui. Programos endeminėse zonose kontrolei. Poterapinei kontrolei.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermenčių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Schistosoma mansoni* tirpiaisiais antigenais, atlikimui. Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

| | | | | |
|--------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------|-----|------------|
| WELL | 9600-01 | Laužomos ELISA juostelės su <i>Schistosoma mansoni</i> tirpiaisiais antigenais | 96 | šulinėliai |
| DILB | 9600-02 | Koncentruotas skiedimo buferis (10 x) | 50 | ml |
| WASH | 9600-03 | Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9600-04 | Fermento buferis | 50 | ml |
| STOP | 9600-05 | Stabdomas tirpalas (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9600-06 | Neigiamas kontrolinis serumas | 200 | μl |
| CONTROL -/+ | 9600-07 | Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė) | 200 | μl |
| CONTROL + | 9600-08 | Teigiamas kontrolinis serumas | 200 | μl |
| CONJ | 9600-09 | Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas | 300 | μl |
| SUBS | 9600-10 | Fosfatazės substratas | 20 | tablečių |
| | | Multipipetės rezervuaras, 25 ml | 1 | vienetas |
| | | Rémelis – ELISA 8-šulinėlių laikikliams | 1 | vienetas |

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°- 8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

ELISA šulinėliai: atidaryti folinio maišelio 9600-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9600-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9600-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9600-06 – 9600-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

Tiriamas serumas: praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 9600-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 9600-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9600-10 nepraskiestame buferyje 9600-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9600-05 naudoti neskietą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 9600-02, 9600-03, 9600-04 ir 9600-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_3Na). Tirpalas 9600-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9600-05 (0,5 M K_3PO_4) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9600-06 – 9600-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

| | | | Naudojamų šulinėlių skaičius | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 |
| Skiedimo buferis (10 x) | 9600-02 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Plovimo tirpalas (10 x) | 9600-03 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Konjugatas | 9600-09 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Kontrolinis serumas | 9600-06 to -08 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 |
| Tiriamas serumas | Serumas + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| Substrato tirpalas | 9600-10 + 9600-04 | tabl. + ml | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 |

Procedūra:

1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

Įpilti 100 μ l skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės šulinėlį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 μ l praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 μ l kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 μ l).

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 μ l praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 μ l substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 μ l stabdomojo tirpalo.

5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9600-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo šistosomiazės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9600-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš **Schistosoma mansoni** tirpiasis antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9600-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš **Schistosoma mansoni** tirpiasis antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Tyrimų rezultatai turi būti interpretuojami atsižvelgiant į kryžminį reaktyvumą su kitomis parazitinėmis infekcijomis (paminėtomis žemiau), klinikinius simptomus ir endeminę situaciją.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

Testas taip pat nustato *Schistosoma haematobium* infekuotus pacientus.

94% jautrumas buvo nustatytas testuojant 80 pacientų, kuriems parazitologiškai patvirtinta šistosomiazė (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* ir 2/3 įvairios infekcijos) ar teigiama specifinė Western-blot (13/13) serologija, serumų.

99 % specifiškumas nustatytas su 122 kraujo donorų serumais (šveicarų).

94% specifiškumą gautas testuojant 141 paciento, turinčio kitas parazitines infekcijas, serumus. Amebiazė (0/8), cisticerkozė (0/3), faskolazė (0/5), filariozė (3/21), hidatidozė (1/27), leišmaniozė (3/11), strongiloidozė (0/13), trichineliozė (1/9), toksokarozė (0/5), toksoplazmozė (1/20) ir maliarija (0/19). Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikeriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius 24 šulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

| | Atsikartojamumas | | Atkuriamumas | |
|---------------------------------------------|------------------|-----------|--------------|-----------|
| | Mėginys 1 | Mėginys 2 | Mėginys 1 | Mėginys 2 |
| Vidurkis (absorbcija) | 0.412 | 1.249 | 0.407 | 1.246 |
| Standartinis nuokrypis (absorbcijos) | 0.031 | 0.067 | 0.029 | 0.076 |
| Pokyčio koeficientas (%) | 7.6 | 5.3 | 7.1 | 6.1 |

Literatūros šaltiniai:

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

