

SCHISTOSOMA MANSONI

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human Schistosomiasis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9600
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/17983



Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af schistosomiasis, særligt under den invasive fase, når få eller ingen æg er udsondret, gennem detektering af specifikke antistoffer i rejsende, som vender tilbage fra endemiske områder, med hyppig kontakt med frisk vand. Undersøgelse af rejsefæller i bekræftede tilfælde. Kontrolprogrammer i endemiske områder. Post-terapeutiske kontroller.

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyser (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Schistosoma mansoni* opløselige antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9600-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Schistosoma mansoni</i> opløselige antigener	96	brønde
DILB	9600-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9600-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9600-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9600-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	9600-07	Svagt positivt serum	200	µl
CONTROL +	9600-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	9600-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	9600-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μl). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklebende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9600-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9600-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9600-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μl kontrolsera 9600-06 til -08 i 190 μl fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μl serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9600-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 9600-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9600-10 i ufortyndet buffer 9600-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 9600-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 9600-02, 9600-03, 9600-04 og 9600-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (N_3Na). Løsning 9600-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9600-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9600-06 til -8) er fra kaniner.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9600-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9600-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9600-09 + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9600-06 til -8 + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 8% af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9600-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af schistosomiasis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9600-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Schistosoma mansoni** opløselige antigener klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er **positivt**, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af den svagt positive kontrol 9600-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Schistosoma mansoni** opløselige antigener for at være klinisk signifikant. Fortolkningen af dette resultat bør inddrage krydsreaktiviteter af andre parasitinfektioner (understående), de kliniske symptomer og den endemiske situation.

Analysens sensitivitet og specificitet:

Testen opdager også *Schistosoma haematobium* inficerede patienter.

En **sensitivitet** på **94%** blev fundet med 80 sera fra patienter med parasitologisk bevist schistosomiasis (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* og 2/3 blandede infektioner) eller positiv, specifik serologi på Western Blot (13/13).

En **specificitet** på **99%** blev fundet med 122 sera fra bloddonorer (schweiziske).

Testen af 141 patienter med andre parasitinfektioner viste en **specificitet** på **94%**. Amebiasis (0/8), cysticercosis (0/3), fascioliasis (0/5), filariasis (3/21), hydatidosis (1/27), leishmaniasis (3/11), strongyloidosis (0/13), trichinellosis (1/9), toxocarosis (0/5), toxoplasmosis (1/20) og malaria (0/19).

Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	0,412	1,249	0,407	1,246
Standardafvigelse (absorbans)	0,031	0,067	0,029	0,076
Variationskoefficient (%)	7,6	5,3	7,1	6,1

Referencer:

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

