

# SCHISTOSOMA MANSONI

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av mänskliga Schistosomiasis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9600

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/17983



## Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) av schistosomiasis, speciellt under den invasiva fasen när få eller inga ägg utsöndras, genom detektering av specifika antikroppar i resenärer som återvänder från endemiska områden, med tät kontakt med frisk vatten. Undersökning av resällskap av bekräftade fall. Kontrollprogram i endemiska områden. Post terapeutiska kontroll.

## Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med **Schistosoma mansoni**, lösliga antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

## Material som ingår i kittet (96 provningar):

<b>WELL</b>	9600-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <b>Schistosoma mansoni</b> lösliga antigener	96	brunnar
<b>DILB</b>	9600-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
<b>WASH</b>	9600-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9600-04	Enzym buffert	50	ml
<b>STOP</b>	9600-05	Stopplösning(K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9600-06	Negativt kontrollserum	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9600-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9600-08	Positivt kontrollserum	200	µl
<b>CONJ</b>	9600-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
<b>SUBS</b>	9600-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

## Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

## Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och  $\mu$ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

## Preparationer av reagens innan användning:

**ELISA brunnar:** öppna sidan av aluminium väskan 9600-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

**Utspädningsbuffert:** utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9600-02, 1/10 i destillerat vatten.

**Tvätt lösning:** utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9600-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10  $\mu$ l kontroll sera 9600-06 till -08 i 190  $\mu$ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

**Sera som skall testas:** utspädd 10  $\mu$ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9600-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

**Substratlösning:** Förvärm enzymbuffert 9600-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9600-10 i utspädd buffert. 9600-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tabletten.

**Stopplösning:** använd reagens 9600-05 utspädd.



**Varningar och säkerhetsåtgärder:** lösningar 9600-02, 9600-03, 9600-04 och 9600-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide ( $N_3Na$ ). Lösning 9600-02 innehåller 0.02% av innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9600-05 (0.5 M  $K_3PO_4$ ) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9600-06 till -08) är från kaniner.

## Volymmer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9600-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9600-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9600-09 + utspädningsbuffert	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9600-06 till -08 + utspädningsbuffert	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	$\mu$ l + $\mu$ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## **Procedur:**

### **Steg 1: blockering:**

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

### **Steg 2: inkubation med serumprover:**

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

### **Steg 3: inkubation med konjugat:**

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

### **Steg 4: inkubation med substrat:**

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

### **Steg 5: Mätning av absorbanser:**

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

## Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 8 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9600-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av schistosomiasis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9600-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Schistosoma mansoni** lösliga antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9600-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Schistosoma mansoni** lösliga antigener anses vara kliniskt signifikant. Tolkningen av detta resultat bör överväga korsreaktiviteter av andra parasitinfektioner (stående) de endemiska situationerna och kliniska symptom.

## Känsligheter och specificiteter hos analysen:

Testet upptäcker också *Schistosoma haematobium* infekterade patienter.

En känslighet av 94 % hittades med 80 sera från patienter med parasitologisk bevisade schistosomiasis (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* och 2/3 blandade infektioner) eller positiv specifik serologi på västerländskt blot (13/13).

En Specificitet av 99 % hittades med 122 sera av bloddonator (swiss)

Testet av 141 patienter med andra parasitinfektioner visade en specificitet av 94 %. Amebiasis (0/8), cysticercosis (0/3), fascioliasis (0/5), filariosis (3/21), hydatidosis (1/27), leishmaniasis (3/11), strongyloidosis (0/13), trichinellosis (1/9), toxocarosis (0/5), toxoplasmosis (1/20) and malaria (0/19).

Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller icteric sera inte stör resultatet av testet.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
<b>Genomsnitt (absorbans)</b>	0.412	1.249	0.407	1.246
<b>Standardavvikelse (absorbans)</b>	0.031	0.067	0.029	0.076
<b>Variationskoefficient (%)</b>	7.6	5.3	7.1	6.1

## Referenser:

**Magnaival, J.F., Mansuy, J.M., Villeneuve, L. and Cassaing S.** (2000) A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Région Midi-Pyrénées (Southwestern France). *European journal of Epidemiology* **16** : 179-182.

**Schaffel, R., Nucci, M., Carvalho, E., Braga, M., Almeida, L., Portugal, R. and Pulcheri, W.** (2001) The value of an immunoenzymatic test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65** : 346-350.

**Loutfy, M. R., Wilson, M., Keystone, J. S. and Kain, K. C.**(2002) Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in non endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* : 749-752.

**van Doorn, H.R., Koelewijn, R., Hofwegen, H., Gilis, H., Wetsteyn, J.C.F.M., Wismans, P. J., Sarfati, C., Vervoort, T., van Gool, T.** (2007) Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 438-442.

**Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., et al.** (2014) Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**.

**Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Kroleiecki, A., Albonico, M., et al.** (2015) Accuracy of Five Serologic Tests for the follow-up of *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**.



**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](http://www.bordier.ch)

