

SCHISTOSOMA MANSONI

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la esquistosomiasis humana

96 pruebas inmunoenzimáticas en pocillos individuales destinadas para el uso diagnóstico in vitro y para el uso profesional en el laboratorio

Instructivo de uso para el artículo N° 9600
N° CE: H-CH/CA01/IVD/17983



Utilización destinada del producto:

El kit *Schistosoma mansoni* ELISA está destinado a la detección cuantitativa de anticuerpos IgG contra *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma haematobium* en suero humano. La serología constituye una ayuda para el diagnóstico y no se puede utilizar como el único método de diagnóstico.

Antecedentes:

La esquistosomosis, también conocida como bilharziasis, es causada por helmintos trematodos parásitos como *S. mansoni*, *S. haematobium* o *S. japonicum*. Los seres humanos pueden infectarse al entrar en contacto con agua contaminada con *Schistosoma cercariae* que puede introducirse en el organismo por vía percutánea a través de la piel expuesta. Durante un período de varias semanas, los parásitos juveniles migran a través del tejido del huésped y posteriormente se convierten en helmintos adultos dentro de los vasos sanguíneos del organismo. Una vez que maduran, los helmintos se aparean y las hembras producen huevos. Algunos de estos huevos viajan a la vejiga o al intestino y pasan a la orina o a las heces. Los síntomas son causados principalmente por la reacción del organismo a los huevos de los parásitos presentes en los tejidos afectados. Los síntomas principales son escozor o picazón en la piel en pocos días; fiebre, escalofríos, tos y mialgias en 1-2 meses; dolor abdominal, hígado agrandado y sangre en las heces u orina durante la etapa crónica. El diagnóstico se basa en la detección de huevos en las heces u orina, y un resultado positivo mediante pruebas serológicas.

Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene todo el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas de adsorción (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos separables de microtitulación sensibilizados con antígenos solubles de *Schistosoma mansoni*. Los anticuerpos específicos en la muestra se unirán a estos antígenos y el lavado eliminará los anticuerpos inespecíficos. La presencia de anticuerpos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Una segunda etapa de lavado eliminará el conjugado no unido. El revelado de los anticuerpos unidos se realiza mediante la adición de sustrato pNPP que se torna amarillo en presencia de fosfatasa alcalina. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos de *Schistosoma mansoni* en la muestra. El fosfato potásico se añade para parar la reacción. La densidad óptica a 405 nm se lee con un lector de microplacas ELISA.

La prueba se puede realizar con sistemas automáticos, pero esto debe ser validado por el usuario.

Material que contiene el kit (96 pruebas):

| | | | | |
|--------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------|-----|----------|
| WELL | 9600-01 | Pocillos sensibilizados con antígenos solubles de <i>Schistosoma mansoni</i> | 96 | pocillos |
| DILB | 9600-02 | Tampón de dilución (concentrado 10 x), de color morado | 50 | ml |
| WASH | 9600-03 | Solución de lavado (concentrado 10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 9600-04 | Tampón de la enzima | 50 | ml |
| STOP | 9600-05 | Solución de parada (K ₃ PO ₄ 0,5M) | 25 | ml |
| CONTROL - | 9600-06 | Suero de control negativo (20 x), tapón verde | 200 | μl |
| CONTROL -/+ | 9600-07 | Suero de control débilmente positivo (Cut off, 20 x), tapón amarillo | 200 | μl |
| CONTROL + | 9600-08 | Suero de control positivo (20 x), tapón rojo | 200 | μl |
| CONJ | 9600-09 | Conjugado proteína A - fosfatasa alcalina (50 x), tapón morado | 300 | μl |
| SUBS | 9600-10 | Sustrato de la fosfatasa (para-nitrofenil-fosfato) | 20 | tabletas |
| | | Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml | 1 | pieza |
| | | Cuadro para el soporte de los 8 pocillos de ELISA | 1 | cuadro |

Periodo de validez y conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8°C (transportar a temperatura ambiente), evitar la exposición a largo plazo de los componentes a la luz directa. La fecha de caducidad y el número de lote del kit están impresos en un lado de la caja. Después de la apertura inicial, todos los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad siempre y cuando se almacenen a 2-8°C.

Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas (µl y ml). Recipientes. Tubos de dilución. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a 37°C. Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de 405 nm. Equipo manual o automático para enjuagar los pocillos. Mezclador Vortex. Temporizador.

Preparación de reactivos antes de la utilización:

Ponga todos los reactivos a temperatura ambiente y agítelos antes de usar.

Pocillos sensibilizados: abrir el lado de la bolsa de aluminio 9600-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos (uno para el blanco, tres para los controles más el número de muestras). Poner los pocillos sensibilizados en el soporte de 8 pocillos. Si es necesario, completar las posiciones no utilizadas en el soporte con pocillos ya utilizados. Disponer el/los soporte/s en el cuadro respetando la orientación. Mantenga los pocillos no utilizados sellados en la bolsa con el desecante.

Tampón de dilución: diluir el tampón de dilución concentrado 10 x 9600-02, 1/10 en agua destilada. Esto se usa para la dilución de los controles, las muestras y el conjugado. El tampón de dilución es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9600-03, 1/10 en agua destilada. Si usted desea utilizar su propia solución de lavado, evite tampones que contienen fosfato, lo cual podría inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina. La solución de lavado diluida es estable durante 2 meses a 2-8°C.

Sueros de control: diluir 10 µl de cada suero de control 9600-06 a -08 en 190 µl de tampón de dilución (dilución final: 1/20). Los sueros de control diluidos son estables durante 2 meses a 2-8°C.

Conjugado: diluir el conjugado 9600-09, 1/50 utilizando el tampón de dilución. Diluya el conjugado el día de la prueba. No almacene el conjugado diluido.

Solución de sustrato: disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9600-10 en el tampón de la enzima 9600-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto. Diluya el sustrato el día de la prueba y proteja el tubo de la luz directa. Las tabletas y soluciones de sustrato deben ser incoloras o deben tener solo un ligero matiz amarillo. Si una tableta o una solución de sustrato se vuelve amarilla, es posible que se haya hidrolizado parcialmente y se deba desechar. No almacene la solución de sustrato.

Solución de parada: utilizar el reactivo 9600-05 no diluido.

Recogida y preparación de muestras:

Use suero humano. El suero debe almacenarse a 2-8°C si se analiza en unos pocos días; de lo contrario, consérvelo a -20°C o menor. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras. Agite las muestras en el vórtex y diluya a 1/201 en solución de tampón de dilución (por ejemplo 5 µl de muestra en 1,0 ml).

Precauciones de uso:

Los compuestos tóxicos se encuentran en las siguientes concentraciones:

| Componente | Referencia | Acida sódica (Na ₂ N ₃) | Tiomersal |
|---------------------------|---------------|------------------------------------------------|-----------|
| Tampón de dilución (10 x) | 9600-02 | 0,1 % | 0,02 % |
| Solución de lavado (10 x) | 9600-03 | 0,05 % | / |
| Tampón de la enzima | 9600-04 | 0,01 % | / |
| Sueros de control (20 x) | 9600-06 a -08 | 0,1 % | 0,02 % |
| Conjugado (50 x) | 9600-09 | 0,1 % | / |

En las concentraciones utilizadas, la acida sódica y el tiomersal no presentan ningún riesgo toxicológico en contacto con la piel y las mucosas.

- La solución de parada 9600-05 (0.5 M K₃PO₄) es irritante
- Los sueros de control negativo, cut off y positivo (9600-06 a -08) son sueros de conejo.
- Trate todos los reactivos y las muestras como material potencialmente infeccioso.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes o kits Bordier ELISA.
- No use reactivos de otros fabricantes con reactivos de este kit.
- No use reactivos después de su fecha de caducidad.
- Cierre los viales de reactivo firmemente después de su uso y no intercambie los tapones de rosca para evitar la contaminación.
- Use puntas de pipetas diferentes y limpias para cada muestra.
- No reutilice los micropocillos.

Consideración relativa a la eliminación

Todos los materiales utilizados para esta prueba generalmente se consideran residuos peligrosos. Consulte las leyes y las reglamentaciones nacionales para la eliminación de residuos peligrosos.

Procedimiento:

Durante el análisis, evite la formación de burbujas en los pocillos.

Etapa 1: Bloqueo:

Llenar completamente los pocillos con la solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos a temperatura ambiente (bloqueo de los pocillos).

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

Etapa 2: Incubación con las muestras a analizar:

Llenar el primer pocillo de la tira con 100 µl de tampón de dilución (Blanco sin suero).

Llenar los 3 pocillos siguientes con 100 µl de suero negativo, débilmente positivo (cut off) y suero positivo respectivamente. Para el análisis de más de 25 muestras, recomendamos llenar los tres últimos pocillos con suero de control como duplicado.

Llenar los otros pocillos con las muestras diluidas (100 µl).

Cubrir los pocillos con un film adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con ~ 250 µl de la solución de lavado.

Etapa 3: Incubación con el conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo (incluido el pocillo blanco, sin suero).

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con ~ 250 µl de la solución de lavado.

Etapa 4: Incubación con el sustrato:

Distribuir 100 µl de la solución del sustrato en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Parar la reacción en adicionando 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.

Etapa 5: Medida de la densidad óptica:

Si fuera necesario, limpiar la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente y eliminar las burbujas de aire. Proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm 1 hora después de la adición de la solución de parada.

Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. Cuando corresponda, calcule los valores medios de densidad óptica de los sueros de control duplicados. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen:

- DO del control positivo > 1.200
- DO del control negativo < 8 % del control positivo
- DO del blanco < 0.350

Los controles de calidad de los lotes actuales se encuentran publicados en sitio web: www.bordier.ch.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo 9600-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de esquistosomiasis y los sueros de sujetos sanos. El índice límite de una muestra se define, después de la sustracción del pocillo blanco sin suero, como:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Densidad óptica de la muestra}}{\text{Densidad óptica del suero cut off}}$$

El resultado es **negativo** cuando el índice del suero a analizar es menor de 1,0. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de *Schistosoma mansoni* no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando el índice del suero a analizar es mayor de 1,0. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de *Schistosoma mansoni* es considerado como clínicamente significativo. Indica que el paciente ha estado en contacto con el parásito. Cada laboratorio podría definir una zona gris en función de su población de pacientes. En caso de resultados ambiguos o dudosos, recomendamos repetir la prueba 2-4 semanas después con una muestra fresca.

Sensibilidad y especificidad:

Se observó una sensibilidad de 94% en el suero de 80 pacientes con esquistosomiasis confirmados parasitológicamente (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* y 2/3 infección mixta) ó que presentaban una serología positiva específica por Western Blot (13/13). Se observó una especificidad de 99% en el suero de 122 donantes de sangre (suizos).

Interferencias:

La evaluación interna demostró que los sueros hemorrágicos, lipémicos o ictericos no interfieren con los resultados de la prueba.

Precisión:

La repetitividad ha sido evaluada analizando 2 sueros humanos en 24 pocillos de una placa en una prueba única. La reproducibilidad ha sido evaluada analizando estas 2 muestras repetidas en 10 pruebas diferentes.

| | Repetitividad | | Reproducibilidad | |
|---------------------------------------|---------------|------------|------------------|------------|
| | Muestras 1 | Muestras 2 | Muestras 1 | Muestras 2 |
| Media (densidad óptica) | 0.412 | 1.249 | 0.407 | 1.246 |
| Desviación estándar (densidad óptica) | 0.031 | 0.067 | 0.029 | 0.076 |
| Coefficiente de variación (%) | 7.6 | 5.3 | 7.1 | 6.1 |

Limitaciones:

Se detectó una especificidad del 94 % en 141 sueros de pacientes con otras infecciones parasitarias. La reactividad cruzada ocurre principalmente en pacientes con filariosis y leishmaniosis.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse basándose en los resultados de una única prueba. Un diagnóstico preciso debe tener en cuenta la situación endémica, la historia clínica, la sintomatología, las imágenes y los datos serológicos.

En pacientes inmunodeprimidos y recién nacidos, los datos serológicos tienen un valor limitado.

Bibliografía:

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., Laloo, 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



51037_02 9600 Esp 01.2018

