

SCHISTOSOMA MANSONI

Enzymatický imunologický test pro diagnózu Schistosomiázy u lidí

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. 9600
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/17983



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) schistosomiázy, zvláště během invazivní fáze, když dochází k exkreci několika nebo žádných vajíček, pomocí detekce konkrétních protilátek u cestovatelů vracejících se z endemických oblastí s častým stykem s čerstvou vodou. Vyšetření doprovodu potvrzených případů. Kontrolní programy v endemických oblastech. Post terapeutické kontroly.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících rozpustné antigeny *Schistosoma mansoni*. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9600-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rozpustné antigeny <i>Schistosoma mansoni</i>	96	destiček
DILB	9600-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9600-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9600-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9600-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9600-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9600-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9600-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9600-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9600-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9600-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9600-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 μ l kontrolního séra 9600-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9600-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9600-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9600-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9600-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9600-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9600-02, 9600-03, 9600-04 a 9600-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (NaN_3). Roztok 9600-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9600-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9600-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9600-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9600-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9600-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9600-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ 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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtete hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 8 % A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9600-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů schistosomiázy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9600-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Schistosoma mansoni* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního kontrolního vzorku 9600-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Schistosoma mansoni* považována za klinicky významnou. Interpretace tohoto výsledku musí vzít v úvahu vzájemné reaktivity dalších parazitických infekcí (uvedeny níže), klinické symptomy a endemickou situaci.

Citlivost a specifita analýzy:

Test detekuje také pacienty nakažené parazitem *Schistosoma haematobium*.

Citlivost o hodnotě **94 %** byla zjištěna u 80 sér od pacientů s parazitologicky prokázanou schistosomiázou (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* a 2/3 smíšených infekcí) nebo pozitivní specifickou sérologií na Westernově hybridizaci (13/13).

Specifita o hodnotě **99 %** byla zjištěna u 122 sér dárců krve (Švýcarsko).

Test 141 pacientů s dalšími parazitními infekcemi ukázal **specifitu** o hodnotě **94 %**. Amébiáza (0/8), cysticerkóza (0/3), fasciolóza (0/5), filarióza (3/21), hydatidóza (1/27), leishmanióza (3/11), strongyloidóza (0/13), trichinellóza (1/9), toxocaróza (0/5), toxoplasmóza (1/20) a malárie (0/19).

Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	0,412	1,249	0,407	1,246
Standardní odchylka (absorbance)	0,031	0,067	0,029	0,076
Koeficient odchylky (%)	7,6	5,3	7,1	6,1

Reference:

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 1st three countries joint meeting (French, German and Swiss). Strasbourg.

BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA



Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

