

# SCHISTOSOMA MANSONI

## Enzymatický imunologický test pro diagnózu schistosomózy u člověka

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití

Návod k použití pro produkt č. **9600**  
EC reg. č.: H-CH/CA01/IVD/17983



### Předpokládané použití:

Sada ELISA *Schistosoma mansoni* od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti larvám *Schistosoma mansoni* a *Schistosoma haematobium* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy.

### Pozadí:

Schistosomóza, známá také pod názvem bilharzióza, je způsobena některým z druhů parazitické motolice, například *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* nebo *S. japonicum*. Lidé se mohou nakazit dotykem vody kontaminované cercarií *Schistosomy*, která dokáže vstoupit do lidského těla obnaženou pokožkou. V průběhu období několika týdnů cestují mladí paraziti hostitelskou tkání a postupně se vyvíjejí v dospělé červy a usazují se v tělesných krevních cévách. Jakmile červi dospějí, spáří se a samičky nakladou vajíčka. Některá z těchto vajíček doputují do močového měchýře nebo do střev a proniknou do moči nebo stolice. Symptomy bývají obvykle způsobeny reakcí těla na vajíčka parazita uložená v postižených tkáních. Hlavním symptomem je popelavá a svědivá pleť už po několika dnech; horečka, zimnice, kašel a svalové bolesti se dostaví do 1 - 2 měsíců; v průběhu chronické fáze pak bolesti břicha, zvětšená játra a krev ve stolici nebo v moči. Diagnóza je založena na detekci vajíček ve stolici nebo v moči a pozitivní výsledek sérologického testu.

### Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících rozpustné antigeny *Schistosoma mansoni*. Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Schistosomě mansoni* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodestičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

### Materiály obsažené v sadě (96 testů):

<b>WELL</b>	9600-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rozpustné antigeny <i>Schistosoma mansoni</i>	96	destiček
<b>DILB</b>	9600-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	50	ml
<b>WASH</b>	9600-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9600-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
<b>STOP</b>	9600-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9600-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9600-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9600-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
<b>CONJ</b>	9600-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
<b>SUBS</b>	9600-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

### **Datum spotřeby a skladování:**

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejích součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

### **Nezbytné vybavení, které není součástí sady:**

Pipety (ml a µl). 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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

### **Příprava činidel před použitím:**

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

**Destičky ELISA:** Otevřete bok hliníkové tašky 9600-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

**Tlumicí roztok na ředění:** Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 9600-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Vyplachovací roztok:** Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Kontrolní sérum:** Zředte 10 µl kontrolního séra 9600-06 na -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

**Konjugát:** Zředte konjugát 9600-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

**Roztok substrátu:** rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 9600-10 v nezředěném tlumicím enzymu 9600-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

**Zastavovací roztok:** Použijte neředěné činidlo 9600-05.

### **Odebírání a příprava vzorků:**

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

### **Varování a bezpečnostní opatření:**

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	9600-02	0,1 %	0,02 %
Vyplachovací roztok (10 x)	9600-03	0,05 %	/
Tlumicí enzym	9600-04	0,01 %	/
Kontrolní sérum (20 x)	9600-06 až -08	0,1 %	0,02 %
Konjugát (50 x)	9600-09	0,1 %	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 9600-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9600-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek používejte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.

### **Pokyny k likvidaci odpadu:**

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

### **Postup:**

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

#### **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 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdná).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

#### **Krok 3: Inkubace s konjugátem:**

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky bez séra, prázdné).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

#### **Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:**

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

#### **Krok 5: Měření absorbancí:**

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

### **Interpretace:**

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena 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

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 9600-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů schistosomózy a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s mezní hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Schistosoma mansoni* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než 1,0. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Schistosoma mansoni* považována za klinicky významnou. Svědčí to o tom, že pacient měl kontakt s parazitem.

Šedá zóna by mohla být definována každou laboratoří v závislosti na celkovém počtu pacientů. V mezních či pochybných případech doporučujeme zopakovat test ještě jednou po uplynutí 2-4 týdnů s čerstvými vzorky.

### Citlivost a specificita:

Citlivost 94% byla zjištěna u 80 sér pacientů s parazitologicky ověřenou schistosomatózou. (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* a 2/3 smíšených infekcí) nebo pozitivní specifickou sérologií na Westernově hybridizaci (13/13). Specificita o hodnotě 99% byla zjištěna u 122 sér dárců krve (Švýcarsko).

### Interference:

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

### Upřesnění:

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
<b>Průměr (absorbance)</b>	0.412	1.249	0.407	1.246
<b>Standardní odchylka (absorbance)</b>	0.031	0.067	0.029	0.076
<b>Koeficient odchylky (%)</b>	7.6	5.3	7.1	6.1

### Omezení:

Specificita 94% byla zjištěna u 141 sér pacientů s jinými parazitickými infekcemi. Křížová reaktivita se většinou vyskytuje u pacientů s filariózou a leishmaniózou.

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

### 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., 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 1<sup>st</sup> 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](http://www.bordier.ch)

