

# SCHISTOSOMA MANSONI

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus šistosomatozei nustatyti

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 9600  
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/17983



## Naudojimo paskirtis:

Bordier Schistosoma mansoni ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš *Schistosoma mansoni* ir *Schistosoma haematobium* žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

## Kilmė:

Šistosomozę, dar žinomą kaip bilharzia, sukelia parazitiniai trematodo kirminai, tokie kaip *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* ar *S. japonicum*. Žmonės gali užsikrėsti sąlytyje su vandeniu, užkrėstu *Schistosoma* lervomis, kurios laisvai patenka į kūną per atvirą odą. Per kelias savaites, jauni parazitai migruoja šeimininko kūne ir vėliau kraujagyslėse išsivysto į suaugusias kirmėles. Subrendusios vyriškos ir moteriškos kirmėlės deda kiaušinėlius. Kai kurie iš šių kiaušinėlių keliauja į šlapimo pūslę ar žarną ir patenka į šlapimą ar išmatas. Simptomai dažniausiai pasireiškia organizmo reakcija į pažeistuose audiniuose esančius kiaušinėlius. Pagrindiniai simptomai: keletą dienų niežtinti oda; karščiavimas, drebulys, kosulys ir 1-2 mėnesius raumenų skausmas; pilvo skausmas, padidėjęs kepenys ir kraujas šlapime ar išmatose lėtinėje fazėje. Diagnozė pagrįsta kiaušinėlių aptikimu išmatose ar šlapime ir teigiamu rezultatu atliekant serologinius tyrimus.

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) lauko metu mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Schistosoma mansoni* tirpiaisiais antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintos nesurištos konjugatos. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Schistosoma mansoni* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

<b>WELL</b>	9600-01	Lauko ELISA juostelės su <i>Schistosoma mansoni</i> tirpiaisiais antigenais	96	ulinėliai
<b>DILB</b>	9600-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
<b>WASH</b>	9600-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9600-04	Fermento buferis	50	ml
<b>STOP</b>	9600-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9600-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9600-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9600-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
<b>CONJ</b>	9600-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
<b>SUBS</b>	9600-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

### **Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:**

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutėsono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

### **Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:**

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis maiytuvas. Laikmatis.

### **Reagentų paruoimas prieš naudojimą:**

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i maiomi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio maielio 9600-01oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tučiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tučias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Į naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

**Skiedimo buferis:** praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9600-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Plovimo tirpalas:** praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9600-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9600-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Konjugatas:** praskiesti konjugatą 9600-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

**Substrato tirpalas:** ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9600-10 neskiestame fermento buferyje 9600-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maiyti tol, kol tabletė(ės) visiškai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesa. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

**Stabdomasis tirpalas:** reagentą 9600-05 naudoti neskiestą.

### **Mėginių surinkimas ir paruoimas:**

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumaiyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

### **Išpėjimai ir atsargumo priemonės:**

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9600-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	9600-03	0,05 %	/
Fermento buferis	9600-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9600-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	9600-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9600-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9600-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

### **Atliekų alinimas:**

---

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

### **Procedūra:**

---

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

#### **1 žingsnis: Blokavimas:**

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

#### **2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:**

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

#### **3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:**

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

#### **4 žingsnis: Inkubacija su substratu:**

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

Uždengti ulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną ulinėį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

#### **5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:**

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

### **Interpretacija:**

---

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 8 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prieš orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9600-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) klini kai dokumentuotus serumo atvejus nuo šistosomatozės ir sveiko, mogaus serumų. Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra mažesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Schistosoma mansoni** tirpius antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra auktesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Schistosoma mansoni** tirpius antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitu.

Kiekvienoje laboratorijoje gali būti apibrėžta pilkoji zona priklausomai nuo pacientų populiacijos. Jei rezultatai yra tarpiniai ar keliantys abejonių, rekomenduojame pakartotinai atlikti testą po 2-4 savaičių su nauju mėginiu.

#### Jautrumas ir specifiškumas:

94% jautrumas nustatytas testuojant 80 pacientų serumų su parasitologiškai patvirtinta šistosomatoze (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* ir 2/3 mišrios infekcijos) ar teigiamas specifinis serologinis tyrimas western-blot (13/13). 99% specifiškumas nustatytas, testuojant 122 kraujo donorų serumų (šveicarų).

#### Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

#### Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
<b>Vidurkis (absorbicija)</b>	0.412	1.249	0.407	1.246
<b>Standartinis nuokrypis (absorbicijos)</b>	0.031	0.067	0.029	0.076
<b>Pokyčio koeficientas (%)</b>	7.6	5.3	7.1	6.1

#### Apribojimai:

94% specifiškumas nustatytas testuojant 141 paciento serumų su kitomis parazitinėmis infekcijomis. Kryžminis reaktyvumas gali įvykti pacientams su filarioze ir leišmanioze.

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

#### Literatūros altiniai:

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

