

Schistosoma mansoni IgG ELISA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human schistosomiasis

96 analyser på særskilte brønde til in vitro diagnostisk brug og til professionel laboratoriebrug



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9600
UDI-DI: 07640158219607



Tilsigtet anvendelse:

Bordier *Schistosoma mansoni* IgG ELISA kit er beregnet til kvalitativ påvisning af IgG antistoffer mod *Schistosoma mansoni* og *Schistosoma hæmatobium* i humant serum. Serologi er en hjælp til diagnose og kan ikke bruges som eneste diagnosemetode.

Baggrund:

Schistosomiasis, også kendt som bilharzia, skyldes parasitiske trematode orme som *Schistosoma mansoni*, *S. hematobium* eller *S. japonicum*. Mennesker kan inficeres ved at være i kontakt med kontamineret vand med *Schistosoma cercariae*, der kan komme ind i kroppen gennem eksponeret hud. I løbet af en periode på flere uger passere parasitterne gennem værtsvæv og udvikles derefter til voksne orme inde i blodkarrene i kroppen. Når de er vokset, producerer ormene æg. Nogle af disse æg forsætter til blæren eller tarmen og passere ind i urinen eller afføringen. Symptomer skyldes hovedsageligt kroppens reaktion på parasitæg, som findes i de ramte væv. Hovedsymptomer er øm eller kløende hud inden for få dage; feber, kulderystelser, hoste og muskelsmerter inden for 1-2 måneder; mavesmerter, forstørret lever og blod i afføring eller urin under kronisk fase. Diagnosen er baseret på ægdetektion i afføring eller urin og et positivt resultat ved serologisk testning.

Princip og præsentation:

Kittet giver alt det materiale som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA), på skrøbelige mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med ***Schistosoma mansoni*** opløselige antigener. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Afsløring af bundne antistoffer vil ske ved tilsætning af pNPP substrat, som bliver gul i nærvær af alkalisk phosphatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Schistosoma mansoni*-specifikke antistoffer i prøven. Kaliumphosphat tilsættes for at stoppe reaktionen. Absorbans ved 405 nm læses ved anvendelse af en ELISA mikrolade læser.

Pr Prøven er manuel, men kan udføres med automatiske systemer, som skal valideres af brugeren.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9600-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Schistosoma mansoni</i> opløselige antigener	96	brønde
DILB	9600-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml
WASH	9600-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9600-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9600-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL +/-	9600-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL +	9600-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ	9600-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl
SUBS	9600-10	Fosfatase-substrat (Para-nitrophenylphosphat)	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet mellem +2°C og +8°C (transport valideret mellem -20°C og +37°C i 21 dage), undgå langsigtet eksponering af komponenterne i direkte lys. Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen. Efter første åbning er alle reagenser stabile indtil udløbsdatoen, dette er om de opbevares mellem +2°C og +8°C.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and µl). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selveklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på +37°C. ELISA læser indstillet på 405 nm. Manuel eller automatisk udstyr til skylning af brønde. Vortex mixer. Timer.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Bring alle reagenser til en temperatur på mellem +20°C og +30°C i mindst 1 time, og bland dem før brug.

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9600-01, og tag det nødvendige antal brønde. (en for blankt, tre for kontroller plus antal prøver). Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9600-02, 1/10 i destilleret vand. Dette anvendes til fortynding af kontroller, prøver og konjugater. Den fortyndede buffer er stabil i 2 måneder mellem +2°C og +8°C.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9600-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase. Den fortyndede vaskeopløsning er stabil i 2 måneder mellem +2°C og +8°C.

Kontrolsera: fortynd 10 µl kontrolsera 9600-06 til -08 i 190 µl fortyndingsbufferopløsning (endelig fortynding 1/20). Den fortyndede kontrolsera er stabil i 2 måneder mellem +2°C og +8°C.

Konjugat: fortyndet konjugat 9600-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9600-10 i ufortyndet enzym buffer 9600-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst. Fortynd substratet på analysedagen og beskyt røret fra direkte lys. Tabletter og substratopløsninger bør være farveløse eller bør kun have en lille gul tinge. Hvis en tablet eller en substratopløsning bliver gul, kan den have været delvis hydrolyseret og bør kasseres. Opbevar ikke substratopløsningen.

Stopløsning: anvend reagens 9600-05 ufortyndet.

Prøveudtagning og forberedelse:

Brug humant serum. Opbevares mellem +2°C og +8°C, hvis analysen foretages inden for 7 dage, ellers opbevares ved -20°C eller lavere. Undgå at gentage frysning og optøning. Vortex prøver og fortynd 1/201 i fortyndingsbufferopløsning (fx 5 µl prøve i 1,0 ml). Opbevar ikke den fortyndede prøve.

Advarsler og sikkerhedshensyn:

Giftige stoffer findes i følgende koncentration:

Komponent	Reference	Natriumazid (N _a N ₃)	Merthiolat
Fortyndingsbuffer (10 x)	9600-02	0,1%	0,02%
Vaskeopløsning (10 x)	9600-03	0,05%	/
Enzymbuffer	9600-04	0,01%	/
Kontrolsera (20 x)	9600-06 til -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9600-09	0,1%	/

Ved de anvendte koncentrationer har natriumazid og merthiolat ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinder.

Komponent	Farlig komponent	Fare-piktogram	Faresætning	Forsigtighedserklæring
Stopløsning	kaliumfosfat, trebasisk		Forårsager alvorlige øjenskader	Bær øjenbeskyttelse. VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9600-06 til -08) er af animalsk oprindelse (kaniner) og skal håndteres med forsigtighed.
- Behandle alle reagenser og prøver som potentielt infektiøst materiale.
- Byt ikke reagenser fra forskellige partier eller Bordier ELISA kits.
- Brug ikke reagenser fra andre producenter med reagenser i dette kit.
- Brug ikke reagenser efter deres udløbsdato.
- Luk reagensflasker tæt straks efter brug, og udskift ikke skruehætter for at undgå forurening.
- Brug separate og rene pipetter tips til hver prøve.
- Mikrobrønde må ikke genbruges.
- Undgå forringelse af mikrobrønde ved mekanisk påvirkning (spidser/kegler, dyser).
- Beskrivelser af de anvendte symboler på etiketterne kan findes på hjemmesiden www.bordier.ch.

Vedrørende Bortskaffelse:

Alle materialer, der bliver anvendt i denne test, betragtes generelt som farligt affald. Henvi til nationale og regionale love og bestemmelser for bortskaffelse af farligt affald.

Procedure:

Når du kører analysen, undgå at der dannes bobler i brøndene.

Trin 1: Præinkubation:

Fyld brøndene med 250 µl fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter mellem +20°C og +30°C.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med prøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (ikke-serumblank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med henholdsvis 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrol serum. Til analyser med mere end 25 prøver anbefaler vi at fylde de tre sidste brønde med kontrol sera som et duplikat.

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera prøver (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern sera, og vask 4 x ~ 250 µl med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet konjugat i hver brønd. (inklusive ikke-serumblank).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med ~ 250 µl vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Hvis det er nødvendigt, tør bunden af brøndene af, og fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm. inden for 1 time efter tilsætning af stopopløsning.

Fortolkning:

Træk værdien af ikke-serumblank fra alle målte værdier. Når det er relevant, beregnes de gennemsnitlige absorbansværdier for duplikeret serumkontrol. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt:

- Absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200
- A med svag positiv kontrol > 10% af A med positiv kontrol
- A af negativ kontrol < 8% af A af positiv kontrol
- A af ikke-serumblank < 0,350

Hvis prøven leverer et signal, der overskrider mikropladelæserens måleområde, skal den værdi, der svarer til læserens øvre måleområde, tilskrives.

Kvalitetskontrol af aktuelle partier offentliggøres på vores hjemmeside: www.bordier.ch.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9600-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af schistosomiasis og sunde, humane sera. Afsnitets afskårne indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serumblank som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{Absorbans prøve}}{\text{Absorbans afskåret serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når Indeks af den analyserede prøve er lavere end **1,0**. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Schistosoma mansoni** antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når Indeks af den analyserede prøve er højere eller lig med **1,0**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Schistosoma mansoni** antigener at være klinisk signifikant. Det indikerer, at patienten har haft kontakt med parasitten.

En grå zone kan defineres af hvert laboratorium i overensstemmelse med dets patientpopulation. I tilfælde af grænseoverskridende eller tvivlsomme resultater anbefaler vi at gentage testen igen 2-4 uger senere med en frisk prøve.

I tilfælde af et positivt eller tvivlsomt resultat, anbefaler vi at udføre en bekræftelsestest (ofte med western blotting), hvis en sådan test er tilgængelig eller kræves i henhold til nationale bestemmelser.

Analytisk ydeevne:

Analytisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 87 % hos 178 sera fra patienter med andre parasitære infektioner. Krydsreaktivitet forekommer hovedsageligt hos patienter med filarioser og leishmaniose.

Der blev ikke observeret nogen positiv eller negativ interferens med suprafysiologiske koncentrationer af hæmoglobin, lipider eller bilirubin i sera suppleret med interferenter.

Præcision:

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i to eksemplarer i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	0,412	1,249	0,407	1,246
Standardafvigelse (absorbans)	0,031	0,067	0,030	0,083
Variationskoefficient (%)	7,6	5,3	7,4	6,7

Kliniske præstationer:

Diagnostisk følsomhed:

Der blev fundet en følsomhed på 93 % med 99 sera fra patienter med parasitologisk påvist schistosomiasis (36/40 *S. mansoni* og 28/30 *S. haematobium*) eller med positiv specifik serologi på western blotting (28/29).

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 99 % blev fundet med 122 sera fra bloddonorer (schweiziske).

Positiv og negativ prædiktiv værdi:

Der blev fundet en PPV på 88% og en NPV på 85% hos de ovenfor nævnte populationer.

Forventede værdier i normale og berørte populationer:

I en normal population på 180 schweiziske bloddonorer og 96 sera fra en schweizisk infektologisk enhed er den forventede indekssværdi 0,20. I en påvirket population på 31 sera fra patienter, der lider af skistosomiasis, er den forventede indekssværdi 3,92.

Hændelser:

Enhver alvorlig hændelse, der indtræffer i forbindelse med udstyret, skal meddeles fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

Begrænsninger:

Diagnose af en smitsom sygdom bør ikke udarbejdes på basis af et enkelt testresultat. En præcis diagnose bør tage hensyn til endemisk situation, klinisk historie, symptomatologi, billeddannelse samt serologiske data.

Hos immunkompromitterede patienter og nyfødte er serologiske data af begrænset værdi.

Referencer:

Beltrame, A., Guerriero, M., Angheben, A., Gobbi, F., Requena-Mendez, A., Zammarchi, L. et al. (2017) Accuracy of parasitological and immunological tests for the screening of human schistosomiasis in immigrants and refugees from African countries: An approach with Latent Class Analysis. PLoS Negl Trop Dis 11 : e0005593.

Hoekstra, P. T., Van Esbroeck, M., De Dood, C. J., Corstjens, P., Cnops, L. et al. (2021) Early diagnosis and follow-up of acute schistosomiasis in a cluster of infected Belgian travellers by detection of antibodies and circulating anodic antigen (CAA): A diagnostic evaluation study. Trav Med Inf Dis 41 : 102053.

Tamarozzi, F., Ursini, T., Hoekstra, P. T., Silva, R., Costa, C., Gobbi, F. et al. (2021) Evaluation of microscopy, serology, circulating anodic antigen (CAA), and eosinophil counts for the follow-up of migrants with chronic schistosomiasis: a prospective cohort study. Parasites and Vectors 14 : 101186.

Olios, E., Angoulvant, A., Marteau, A., Paris, L., Bouchaud, O., Guegan, H. et al. (2023) Chronic schistosomiasis imported in France: A retrospective multicentre analysis of 532 patients, calling for international recommendations. Trav Med Inf Dis 56 : 102644.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

