

Schistosoma mansoni IgG ELISA

Encimski imunski test za diagnozo shistosomioze pri ljudeh

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 9600
UDI-DI: 07640158219607



Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Schistosoma mansoni* IgG ELISA je namenjen kvalitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti *Schistosoma mansoni* in *Schistosoma haematobium* v človeškem serumu. Serologija je pomoč pri diagnosticiranju in je ni mogoče uporabiti kot edino diagnostično metodo.

Ozadje:

Shistosomioza, poznana tudi kot bilharzija, je posledica zajedavskih črvov metljajev (trematoda), kot so *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* ali *S. japonicum*. Ljudje se lahko okužijo v stiku s kontaminirano vodo s cerkarijami *Strongyloides*, ki lahko perkutano vstopijo v telo prek izpostavljene kože. V obdobju nekaj tednov se mladi zajedavci selijo po tkivu gostitelja in se nato razvijejo v odrasle črve v krvnih žilah telesa. Ko dozori, se črvi pari in samice proizvedejo jajčeca. Nekatera od teh jajčec potujejo do mehurja ali črevesja in prehajajo v urin ali blato. Simptomi so večinoma posledica reakcije telesa na jajčeca zajedavcev v prizadetih tkivih. Glavni simptomi so izpuščaji ali srbeča koža v nekaj dneh; vročina, mrzlica, kašelj in bolečine v mišicah v 1-2 mesecih; bolečine v trebuhu, povečana jetra in kri v blatu ali urinu v kroničnem stadiju. Diagnoza temelji na odkritju jajčec v blatu ali urinu in pozitivnem rezultatu serološkega testiranja.

Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z topnimi antigeni *Schistosoma mansoni*. Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost zajedavsko specifičnih protiteles se odkrije s konjugatom proteina A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Schistosoma mansoni* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčitava z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test je ročni, vendar ga lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, ki jih mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

Material v kompletu (96 testov):

WELL	9600-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z topnimi antigeni <i>Schistosoma mansoni</i>	96	vdolbinic
DILB	9600-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
WASH	9600-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
ENZB	9600-04	Encimski pufer	50	ml
STOP	9600-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	μl
CONTROL -/+	9600-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	μl
CONTROL +	9600-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	μl
CONJ	9600-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	μl
SUBS	9600-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablete
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet shranjujte med +2°C in +8°C (transport veljaven med -20°C in +37°C 21 dni), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete med +2°C in +8°C.

Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in μl). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na +37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente hranite na temperaturi med +20°C in +30°C vsaj 1 uro in jih pred uporabo premešajte.

Vdolbinice ELISA: odprite stran aluminijaste vrečke 9600-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 9600-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je med +2°C in +8°C stabilen 2 meseca.

Raztopina za pranje: razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 9600-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrom, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je med +2°C in +8°C stabilna 2 meseca.

Kontrolni serumi: razredčite 10 µl kontrolnega seruma 9600-06 do -08 v 190 µl raztopine pufru za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so med +2°C in +8°C stabilni 2 meseca.

Konjugat: razredčite konjugat 9600-09 v raztopini pufru za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

Raztopina substrata: raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 9600-10 v nerazredčenem encimskem pufru 9600-04 (1 tableta v 2,5 ml pufru). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtenek. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

Raztopina za zaustavitev: uporabite nerazredčen reagent 9600-05.

Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti med +2°C in +8°C, če test izvedete v 7 dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju. Vzorce premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufru za redčenje (na primer 5 µl vzorca v 1,0 ml). Ne shranjujte razredčenega vzorca.

Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (NaN ₃)	Mertiolat
Pufer za redčenje	9600-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	9600-03	0,05%	/
Encimski pufer	9600-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	9600-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9600-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

Komponenta	Nevarna komponenta	Piktogram nevarnosti	Izjava o nevarnosti	Previdnostna izjava
Raztopina za zaustavitev	kalijev fosfat, tribazični		Povzroča hude poškodbe oči	Nositi zaščitne za oči. PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (9600-06 do -08) so živalskega izvora (kunci) in z njimi je treba ravnati previdno.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjujte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjujte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu www.bordier.ch.

Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

1. korak: Predinkubacija:

Vdolbinice napolnite z 250 µl raztopine pufru za redčenje.

Inkubirajte 5 do 15 minut med +20°C in +30°C.

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufru za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri +37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 10% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 8% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

V primeru, da vzorec oddaja signal, ki presega merilno območje čitalnika mikroplošč, je treba pripisati vrednost, ki ustreza zgornjemu merilnemu območju čitalnika.

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani www.bordier.ch.

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov shistosomiaz in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 9600-07. Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Schistosoma mansoni** klinično nepomembna.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji ali enak **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom **Schistosoma mansoni** klinično pomembna. To pomeni, da je imel bolnik stik s parazitom.

Vsak laboratorij lahko opredeli svojo cono glede na populacijo bolnikov. V primeru mejnih ali dvomljivih rezultatov priporočamo ponovitev testa ponovno po 2-4 tednih s svežim vzorcem.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

Analitične zmogljivosti:

Analitična specifičnost:

Pri 178 serumih bolnikov z drugimi zajedavskimi okužbami je bila ugotovljena 87-odstotna specifičnost testa. Navzkrižna reaktivnost se pojavlja večinoma pri bolnikih s filariozo in lišmaniozo.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopolnjenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

Natančnost:

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v dvojniku na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
Povprečje (absorbanca)	0,412	1,249	0,407	1,246
Standardni odklon (absorbanca)	0,031	0,067	0,030	0,083
Koeficient variacije (%)	7,6	5,3	7,4	6,7

Klinične zmogljivosti:

Diagnostična občutljivost:

Pri 99 serumih bolnikov z zajedavsko dokazano shistosomiozo (36/40 *S. mansoni* in 28/30 *S. haematobium*) ali s pozitivno specifično serologijo po postopku western-blot (28/29) je bila ugotovljena 93-odstotna občutljivost testa.

Diagnostična specifičnost:

Pri 122 serumih (švicarskih) krvodajalcev je bila ugotovljena 99-odstotna specifičnost testa.

Pozitivna in negativna napovedna vrednost:

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 88% in NPV 85%.

Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:

Pri zdravi populaciji 180 švicarskih krvodajalcev in 96 serumov iz švicarske enote za infektologijo je pričakovana indeksna vrednost 0,20. Pri prizadeti populaciji 31 serumov bolnikov s shistosomiozo je pričakovana indeksna vrednost 3,92.

Incidenti:

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

Omejitve:

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

Reference:

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

