

# Schistosoma mansoni IgG ELISA

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 - UDI-DI: 07640158219607



## Naudojimo paskirtis:

Bordier *Schistosoma mansoni* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prie *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, padidėjusios 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) laukuose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Schistosoma mansoni* tirpiaisi 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 pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėdamas pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Schistosoma mansoni* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija esant 405 nm nuskaitoma 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	Laukoms ELISA juostelės su <b><i>Schistosoma mansoni</i></b> tirpiaisi 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	Stabdomasis 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
		Rėmelis - ELISA 8- šulinėlių laikikliams	1	vienetas

## Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine vieta. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės ono. 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 maiytuvai. Laikmatis.

## Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir ištirti maišomi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio maišelio elio 9600-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į dėmelį teisinga kryptimi. I 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). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti ištirpęs, todėl reikia ištirti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

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

## Mėginių surinkimas ir paruošimas:

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

## Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiški junginiai atsiranda naudojant šią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>2</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 triušų.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galima infekcinę medžiagą.
- Nemašyti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su šio rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitalioti dangtelių, kad būtų ištengta užterštumo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis šalies 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 iš siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

### 2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėlį (mėginį be serumo).

Į kitus tris iš 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 ulinėlį (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 ulinėlį.

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

Sustabdyti reakciją į kiekvieną ulinėlį 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 tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutinės absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 10% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 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) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo šistosomatozės ir sveiko žmogaus 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 žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Schistosoma mansoni* antigenus yra kliniškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Schistosoma mansoni* antigenus yra laikoma kliniškai 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.

Jeigu rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

## Analitiniai pasirodymai:

### Analitinis specifiškumas:

87% specifiškumas nustatytas 178 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems filarioze ir leišmanioze.

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

### 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
Vidurkis (absorbcija)	0,412	1,249	0,407	1,246
Standartinis nuokrypis (absorbcijos)	0,031	0,067	0,029	0,076
Pokyčio koeficientas (%)	7,6	5,3	7,1	6,1

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijiškumas

## Klinikiniai pasirodymai:

### Diagnostinis jautrumas:

Buvo nustatytas 93% jautrumas 99 serumams, gautiems iš pacientų, sergančių parazitologiškai įrodyta šistosomioze (36/40 *S. mansoni* ir 28/30 *S. haematobium*) arba su teigiama specifine serologija Western blot (28/29).

### Diagnostikos specifiškumas:

99% specifiškumas buvo nustatytas naudojant 122 kraujo donorų serumus (Šveicarijas).

### Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 88% PPV ir 85% NPV.

### Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 180 Šveicarijos kraujo donoriai ir 96 serumų iš Šveicarijos gydymo įstaigų infekcinių ligų skyriaus, numatoma Indekso vertė yra 0,20. Paveiktoje populiacijoje, kurią sudaro 31 serumas iš pacientų, sergančių šistosomioze, numatoma Indekso vertė yra 3,92.

### Incidentai:

Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

### Apribojimai:

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 šaltiniai:

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.

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.



**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

