

SCHISTOSOMA MANSONI

Test immunoenzimatico per la diagnostica della bilarziosi

96 tests su astine sezionabili destinate ad uso **in vitro**

Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9600
N° CE: H-CH/CA01/IVD/17983



Uso previsto del prodotto:

Diagnosi sierologica (IgG) della bilarziosi in pazienti che hanno soggiornato in zone endemiche effettuando bagni in acqua dolce, soprattutto durante la fase invasiva quando la diagnosi parassitologica della malattia è difficile. Ricerca nei compagni di viaggio di soggetti affetti da bilarziosi e studi epidemiologici in zone endemiche. Controllo post-terapia.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti sensibilizzati con antigeni solubili di **Schistosoma mansoni**. La presenza di anticorpi sierici specifici rispetto agli antigeni parassitari è evidenziata mediante un coniugato proteina A-fosfatasi alcalina. I pozzetti sono suddivisi in astine separabili, che permettono di testare economicamente piccole serie di campioni.

Materiale contenuto nel kit (96 tests):

WELL	9600-01	Pozzetti sensibilizzati con antigeni solubili di Schistosoma mansoni , su astine separabili	96	pozzetti
DILB	9600-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x)	50	ml
WASH	9600-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9600-04	Tampone dell' enzima	50	ml
STOP	9600-05	Soluzione d'arresto (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9600-06	Siero di controllo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9600-07	Siero di controllo debolmente positivo (soglia)	200	µl
CONTROL +	9600-08	Siero di controllo positivo	200	µl
CONJ	9600-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina	300	µl
SUBS	9600-10	Substrato della fosfatasi	20	Compress e
		Riserva di reattivi per multipipette, 25 ml	1	Pezzo
		Quadro di sostegno per il contenitore dei pozzetti	1	Quadro

Conservazione:

Conservare il kit tra 2° e 8° C (trasporto a temperatura ambiente). La data di scadenza e il numero del lotto sono stampati sul lato della scatola.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (μl e ml). Recipienti. Provette per la diluizione dei sieri. Bande adesive per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C . Lettore ELISA tarato ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9600-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti. Mettere i pozzetti in un supporto. Se necessario, completare le posizioni non utilizzate del supporto con dei pozzetti già usati. Mettere il supporto in un quadro rispettando il suo orientamento. Conservare le astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9600-02, 1/10 in acqua distillata.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9600-03, 1/10 in acqua distillata. Se volete utilizzare la vostra soluzione di lavaggio, evitate i tamponi che contengono fosfato e che potrebbero inibire successivamente l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina.

Sieri di controllo negativi, debolmente positivi (soglia) e positivi: diluire 10 μl di ogni siero di controllo 9600-06 a -08 in 190 μl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20).

Sieri da testare: diluire 10 μl di siero in 2.0 ml della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/201).

Coniugato proteina A - fosfatasi alcalina: diluire il coniugato 9600-09, 1/51 nella soluzione tampone di diluizione.

Soluzione di substrato: equilibrare alla temperatura ambiente il tampone dell'enzima 9600-04. Prima di aggiungere ai pozzetti ELISA il substrato della fosfatasi dissolvere il numero necessario di compresse di substrato 9600-10 nel tampone dell'enzima 9600-04 non diluito (una compressa in 2.5 ml di tampone). Vortexare fino a scioglimento completo della compressa.

Soluzione d'arresto: utilizzare il reagente N° 9600-05 non diluito.



Precauzioni d'uso: Le soluzioni 9600-02, 9600-03, 9600-04 e 9600-09 contengono rispettivamente 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.1% di azoturo di sodio (NaN_3). La soluzione 9600-02 contiene 0.02% di merthiolato. Queste sostanze sono tossiche. La soluzione d'arresto 9600-05 (0.5 M K_3PO_4) è irritante.

I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (9600-06 a -08) provengono da conigli.

Volumi da preparare:

			Numero di pozzetti da utilizzare			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampone di diluizione (10 x)	9600-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. di lavaggio (10 x)	9600-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Coniugato	9600-09 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sieri di controllo	9600-06 a -08 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sieri da testare	Siero + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Soluzione di substrato	9600-10 + 9600-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Metodo:

Tappa 1: Bloccaggio:

Riempire completamente i pozzetti con la soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti alla temperatura ambiente (bloccaggio dei pozzetti).

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le astine sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con i campioni di siero:

Riempire il primo pozzetto della prima astina con 100 µl di tampone di diluizione ("bianco", senza siero).

Riempire i tre pozzetti seguenti con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo).

Riempire gli altri pozzetti con i sieri da testare diluiti (100 µl)

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare i sieri e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 3: Incubazione con il coniugato:

Distribuire 100 µl del coniugato proteina A - fosfatasi diluito in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 4: Incubazione con il substrato:

Distribuire 100 µl della soluzione di substrato in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Arrestare la reazione aggiungendo a ogni pozzetto 100 µl della soluzione d'arresto.

Tappa 5: Misura della densità ottica:

Asciugare sotto i pozzetti, eliminare le eventuali bolle d'aria e misurare la densità ottica (Assorbimento) alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del "bianco" in assenza di siero da tutti gli altri valori. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti : DO del controllo positivo >1.200, DO del controllo negativo < 8% del controllo positivo, DO del "bianco" misurato contro l'aria < 0.350.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9600-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di bilarziosi e i sieri di soggetti sani.

Il risultato è **negativo** quando la densità ottica del siero da testare è più bassa di quella del siero soglia 9600-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni solubili di **Schistosoma mansoni** non è clinicamente significativa.

Il risultato è **positivo** quando la densità ottica del siero da testare è più alta di quella del siero soglia 9600-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni solubili di **Schistosoma mansoni** è considerata clinicamente significativa. Questo risultato orienta verso una bilarziosi. Deve essere interpretato tenendo conto della possibilità di eventuali reazioni crociate con le parassitosi citate qui sotto e secondo i dati della anamnesi.

Sensibilità e specificità del test:

Il test evidenzia anche i pazienti infettati da *Schistosoma haematobium*.

Una **sensibilità del 94 %** è stata osservata con 80 sieri provenienti da pazienti che presentavano una bilarziosi confermata parassitologicamente (34/37 *Schistosoma mansoni*, 26/27 *Schistosoma haematobium* e 2/3 infezione mista) o che presentavano una sierologia positiva specifica in western-blot (13/13). Una **specificità del 99 %** è stata osservata con 122 sieri di donatori di sangue (svizzeri).

Una **specificità del 94 %** è stata osservata con 141 sieri provenienti da gruppi di pazienti affetti da altre parassitosi. Amebiasi (0/8), strongiloidosi (0/13), cisticercosi (0/3), distomatosi (0/5), filariosi (3/21), idatidosi (1/27), leishmaniasi (3/11), trichinellosi (1/9), toxocariasi (0/5), toxoplasmosi (1/20) e malaria (0/19). Uno studio interno ha mostrato che i sieri lipemici, itterici o emolisati non presentavano problemi per la realizzazione di questo test.

La ripetibilità è stata valutata testando 2 sieri umani in 24 pozzetti di una micropiastra in un unico test. La riproducibilità è stata valutata testando questi 2 campioni in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
Media (densità ottica)	0.412	1.249	0.407	1.246
Deviazione-standard (densità ottica)	0.031	0.067	0.029	0.076
Coefficiente di variazione (%)	7.6	5.3	7.1	6.1

Riferimenti bibliografici:

Doenhoff, M.J., Wheeler, J.G., Tricker, K., Hamilton, J.V., Sturrock, R.F., Butterworth, A.E., Ouma, J.H., Mbugua, 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., Laloo, K., Bligh, J., Armstrong, M., Whitty, C.J.M., Doenhoff, M.J. and 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. and 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 1st three countries joint meeting (French, German and Swiss). Strasbourg.

BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.



Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch