

LEISHMANIA INFANTUM

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση σπλαχνικής λείσμανιάσης

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια

Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. 9500
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: H-CH/CA01/IVD/01756



Προβλεπόμενη χρήση:

Ορολογική διάγνωση (IgG) σπλαχνικής λείσμανιάσης Ορο-επιδημιολογικές μελέτες. Ορολογικός έλεγχος ασθενών με HIV από ενδημικές περιοχές. Μεταθεραπευτικός έλεγχος ασθενών με ταυτόχρονη λοίμωξη HIV-Λείσμανιάσης.

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε υποδοχές μικροτιτλοδότησης ευαισθητοποιημένες με διαλυτά αντιγόνα προμαστιγώτου *Leishmania infantum*. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ευαισθητοποιημένες υποδοχές παρέχονται ως εύθραυστες ταινίες για την οικονομική δοκιμή μικρών σειρών δειγμάτων.

Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές)

WELL	9500-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με διαλυτά αντιγόνα <i>Leishmania infantum</i>	96	φρεάτια
DILB	9500-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
WASH	9500-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
ENZB	9500-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
STOP	9500-05	Ανασχετικό διάλυμα (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONTROL -/+	9500-07	Ασθενής θετικός ορός (διακοπή)	200	μl
CONTROL +	9500-08	Θετικός ορός μάρτυρα	200	μl
CONJ	9500-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης	300	μl
SUBS	9500-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	20 1 1	δισκία τεμάχιο τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8° C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού.

Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και μl). Φιάλες. Σωλήνες για την αραιώση του ορού. Κολητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37° C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9500-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται. Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης: αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9500-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα πλύσης: αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 9500-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

Αρνητικός, ασθενής θετικός (διακοπή) και θετικός ορός μάρτυρα: αραιώστε 10 μl ορού μάρτυρα 9500-06 έως -08 σε 190 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/20).

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 μl ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201).

Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης: αραιώστε σύζευγμα 9500-09, σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/51).

Διάλυμα υποστρώματος: προθερμάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9500-04 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν την προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια ELISA, διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9500-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 9500-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων).

Ανασχητικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9500-05 μη αραιωμένο.



Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα: Τα διαλύματα 9500-02, 9500-03, 9500-04 και 9500-09 περιέχουν αντίστοιχα 0,1%, 0,05%, 0,01% και 0,1% αζίδιο του νατρίου (Na_3N_2). Το διάλυμα 9500-02 περιέχει 0,02% μερθειολικού. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές. Το ανασχητικό διάλυμα 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) είναι ερεθιστικό.

Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9500-06 έως -08) προέρχεται από σκύλος.

Όγκοι προς προετοιμασία:

			Συνολικός αριθμός φρεατίων προς χρήση			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)	9500-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9500-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Σύζευγμα	9500-09 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Ορός μάρτυρα	9500-06 έως -08 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Οροί προς δοκιμή	Ορός + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Διάλυμα υποστρώματος	9500-10 + 9500-04	δισκ. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Διαδικασία:

Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

Επώαστε για 5 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικό, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα (100 μl το καθένα).

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τους αραιωμένους ορούς προς δοκιμή (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης σε κάθε φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

Βήμα 4: Επώαστε με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων, εξαλείψτε τις φυσαλίδες και μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm.

Ερμηνεία

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200, A του αρνητικού μάρτυρα < 15% του A του θετικού μάρτυρα, A κενό έναντι αέρα < 0,350.

Η συγκέντρωση αντισωμάτων του ασθενούς θετικού (διακοπή) ορού 9500-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλτιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις λείσμανιάσης και υγιείς ανθρώπινους ορούς.

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9500-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων *Leishmania infantum* είναι κλινικώς μη σημαντική.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν η απορρόφηση του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερη από την απορρόφηση του ασθενούς θετικού ορού 9500-07. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων *Leishmania infantum* θεωρείται κλινικώς σημαντική.

Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Η ευαισθησία της δοκιμής είναι καλύτερη από 95% σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς που πάσχουν από σπλαχνική λείσμανιάση λόγω *L. infantum*. Για ασθενείς με ταυτόχρονη λοίμωξη HIV-*Leishmania* η ευαισθησία της δοκιμής είναι μεταξύ 60 και 85%. Ενδέχεται να προκύψει αρνητικής ορολογία και θετική καλλιέργεια σε αυτούς τους ασθενείς όταν βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή ή έχουν μολυνθεί με άλλα είδη *Leishmania*, όπως *L. major* ή *L. braziliensis*.

Η εξειδίκευση της δοκιμής είναι καλύτερη από 95% με ορούς από Ελβετούς αιμοδότες. Ενδέχεται να προκύψει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε ορισμένες άλλες παρασιτικές λοιμώξεις, όπως η αφρικανική τρυπανοσωμίαση, η νόσος του Chagas και η δερματική και βλεννογονοδερματική λείσμανιάση. Η εσωτερική αξιολόγηση έδειξε ότι αιμορραγικοί, λιπαιμικοί και ικτερικοί οροί δεν παρεμβαίνουν με τα αποτελέσματα της δοκιμής.

Οροί κύνων μπορούν να ελεγχθούν με αυτό το kit με τους ίδιους όρους.

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή. Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (απορρόφηση)	1.005	1.766	1.381	2.187
Τυπική απόκλιση (απορρόφηση)	0.061	0.086	0.097	0.114
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Αναφορές:

Badaro, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C. (1986) Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis : antigen selection for detection of infection specific responses. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 72-78.

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Leport, C., Lebras, J. (1994) Leishmaniose viscérale au cours de l'infection à VIH : avantages du sérodiagnostic par technique ELISA. Pres. Med. **23** : 672-673.

Nassar, N., Gangneux, J.P., Sulahian, A., Derouin, F. (1996) Leishmaniose viscérale au cours du sida : Difficultés du diagnostic sérologique, évaluation d'une nouvelle trousse ELISA. Feuilles de Biologie. **37**: 39-42.

Senaldi, G., Xiao-su, H., Hoessli, D.C., Bordier, C. (1996) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. Journal of Immunological Methods. **193**: 9-15.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. **116**: 193-199.

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

