

LEISHMANIA INFANTUM

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση λείσμανιάσης

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια για in vitro διαγνωστική χρήση και για επαγγελματική εργαστηριακή χρήση

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



Προβλεπόμενη χρήση:

Το kit *Echinococcus granulosus* ELISA της Bordier προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κατηγορίας αντισωμάτων IgG έναντι της *Leishmania infantum* σε ανθρώπινο ορό. Η ορολογία αποτελεί ένα βοήθημα για τη διάγνωση και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η μοναδική μέθοδος διάγνωσης.

Υπόβαθρο:

Η λείσμανιάση είναι μια μεταδιδόμενη μέσω φορέα νόσος που μεταδίδεται από τους φλεβοτόμους. Η μόλυνση εμφανίζεται από διάφορα είδη υποχρεωτικών ενδοκυτταρικών πρωτόζωων του γένους *Leishmania*. Η μόλυνση σε ανθρώπους προκαλείται από περίπου 21 από τα 30 είδη που είναι γνωστό ότι μολύνουν θηλαστικά. Οι πιο κοινές μορφές της νόσου είναι η δερματική λείσμανιάση, οποία προκαλεί δερματικές διαταραχές και η σπλαχνική λείσμανιάση, η οποία επηρεάζει συνήθως τον σπλήνα, το ήπαρ και το μυελό των οστών. Τα κύρια συμπτώματα είναι ο πυρετός, η διόγκωση του σπλήνα και οι δερματικές παθήσεις. Η διάγνωση της σπλαχνικής λείσμανιάσης βασίζεται σε ένα θετικό αποτέλεσμα μέσω ορολογικών εξετάσεων και σε θετική PCR σε αναρροφήσεις μυελού των οστών ή βιοψίες δέρματος.

Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το kit παρέχει όλο το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε εύθραυστα φρεάτια μικροπιλοδότησης ευαισθητοποιημένα με διαλυτά αντιγόνα προμαστιγωτών *Leishmania infantum*. Συγκεκριμένα αντισώματα στο δείγμα θα δεσμευτούν σε αυτά τα αντιγόνα και η πλύση θα απομακρύνει μη συγκεκριμένα αντισώματα. Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων παρασίτων ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης Α - αλκαλικής φωσφατάσης. Ένα δεύτερο στάδιο πλύσης θα απομακρύνει το αδέσμευτο σύζευγμα. Η αποκάλυψη δεσμευμένων αντισωμάτων γίνεται με την προσθήκη υποστρώματος rNPP το οποίο γίνεται κίτρινο παρουσία αλκαλικής φωσφατάσης. Η ένταση χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας των ειδικών αντισωμάτων *Leishmania infantum* στο δείγμα. Προστίθεται φωσφορικό κάλιο για να σταματήσει η αντίδραση. Η απορρόφηση στα 405 nm διαβάζεται χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων ELISA.

Η δοκιμή μπορεί να πραγματοποιηθεί με αυτόματα συστήματα, αλλά κάτι τέτοιο πρέπει να επικυρωθεί από το χρήστη.

Υλικά που περιέχονται στο kit (96 δοκιμές):

WELL	9500-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με διαλυτά αντιγόνα προμαστιγωτών <i>Leishmania infantum</i>	96	φρεάτια
DILB	9500-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα, χρωματισμένο μωβ	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα, (20 x), πράσινο καπάκι	200	μl
CONTROL -/+	9500-07	Ασθενής θετικός ορός μάρτυρα (διακοπή, 20 x), κίτρινο καπάκι	200	μl
CONTROL +	9500-08	Θετικός ορός μάρτυρα (20 x), κόκκινο καπάκι	200	μl
CONJ	9500-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης Α-αλκαλικής φωσφατάσης (50 x), μωβ καπάκι	300	μl
SUBS	9500-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης (παρα-νιτροφαινολοφωσφορικό) Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml	20	δισκία
		Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	1	τεμάχιο
			1	τεμάχιο

Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8°C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος), αποφύγετε τη μακροχρόνια έκθεση των συστατικών στο άμεσο φως. Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού. Μετά το αρχικό άνοιγμα, όλα τα αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης όταν αποθηκεύονται στους 2° έως 8°C.

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. Χειροκίνητος ή αυτόματος εξοπλισμός για φρεάτια πλύσης. Αναμικτήρας με δίνη. Χρονοδιακόπτης.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

Φέρτε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου και αναμείξτε πριν τη χρήση.

Φρεάτια ELISA: ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 9500-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται (ένα για κενό, τρία για μάρτυρες συν τον αριθμό των δειγμάτων). 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. Αυτό χρησιμοποιείται για την αραιώση των μαρτύρων, των δειγμάτων και του συζεύγματος. Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα είναι σταθερό για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

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. Το αραιωμένο διάλυμα πλύσης είναι σταθερό για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

Οροί για δοκιμή: αραιώστε 10 µl ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201). Οι αραιωμένοι οροί μάρτυρες είναι σταθεροί για 2 μήνες στους 2 έως 8°C.

Σύζευγμα: αραιώστε σύζευγμα 9500-09 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/50). Αραιώστε το σύζευγμα την ημέρα της δοκιμής. Μην αποθηκεύετε αραιωμένο σύζευγμα.

Διάλυμα υποστρώματος: διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 9500-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 9500-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων). Αραιώστε το υπόστρωμα την ημέρα της δοκιμής και προστατέψτε τον σωλήνα από το άμεσο φως. Τα δισκία και τα διαλύματα υποστρώματος πρέπει να είναι άχρωμα ή να έχουν μόνο ελαφρά κίτρινη απόχρωση. Εάν ένα δισκίο ή ένα διάλυμα υποστρώματος γίνεται κίτρινο, μπορεί να έχει εν μέρει υδρολυθεί και θα πρέπει να απορρίπτεται. Μην αποθηκεύετε το διάλυμα υποστρώματος.

Ανασχετικό διάλυμα: χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 9500-05 μη αραιωμένο.

Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων:

Χρησιμοποιήστε ανθρώπινο ορό. Ο ορός θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C εάν αναλυθεί μέσα σε λίγες ημέρες, διαφορετικά θα πρέπει να φυλάσσεται στους -20°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία. Αποφύγετε την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη. Ανακατέψτε με δίνη τα δείγματα και αραιώστε 1/201 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (για παράδειγμα 5 µl δείγματος σε 1,0 ml).

Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα:

Οι τοξικές ενώσεις βρίσκονται στην ακόλουθη συγκέντρωση:

Συστατικό	Αναφορά	Αζίδιο του νατρίου (NaN ₃)	Merthiolate
Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)	9500-02	0,1 %	0,02 %
Διάλυμα πλύσης (10 x)	9500-03	0,05 %	/
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	9500-04	0,01 %	/
Οροί μάρτυρα (20 x)	9500-06 έως -08	0,1 %	0,02 %
Σύζευγμα (50 x)	9500-09	0,1 %	/

Στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, το αζίδιο του νατρίου και το merthiolate δεν παρουσιάζουν τοξικολογικό κίνδυνο σε επαφή με το δέρμα και τις βλεννώδεις μεμβράνες.

- Το ανασχετικό διάλυμα 9500-05 (0,5 M K₃PO₄) είναι ερεθιστικό.
- Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (9500-06 έως -08) είναι από σκύλος.
- Αντιμετωπίστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα ως δυνητικά μολυσματικό υλικό.
- Μην ανταλλάσσετε αντιδραστήρια διαφορετικών παρτίδων ή kit ELISA της Bordier.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια άλλων κατασκευαστών με αντιδραστήρια αυτού του kit.
- Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Κλείστε καλά τα φιαλίδια των αντιδραστηρίων αμέσως μετά τη χρήση και μην αλλάζετε τα βιδωτά καπάκια για να αποφύγετε τη μόλυνση.
- Χρησιμοποιήστε ξεχωριστές και καθαρές άκρες πιπέττας για κάθε δείγμα.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε μικροφρεάτια.

Σχετικά με την απόρριψη:

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή αυτή θεωρούνται γενικά επικίνδυνα απόβλητα. Ανατρέξτε στις εθνικές και περιφερειακές νομοθετικές και κανονιστικές διατάξεις για την απόρριψη επικίνδυνων αποβλήτων.

Διαδικασία:

Κατά την εκτέλεση της δοκιμής, αποφύγετε το σχηματισμό φυσαλίδων στα φρεάτια.

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. Για δοκιμές άνω των 25 δειγμάτων, συνιστούμε να γεμίσετε τα τελευταία τρία φρεάτια με ορούς μάρτυρα ως αντίγραφο.

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τα αραιωμένα δείγματα (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 ~ 250 μl.

Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα σε κάθε φρεάτιο (συμπεριλαμβανομένου κενού ορού).

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

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης ~ 250 μl.

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:

Εάν χρειαστεί, καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων και εξαλείψτε τις φυσαλίδες. Μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm εντός 1 ώρας μετά την προσθήκη του ανασχετικού διαλύματος.

Ερμηνεία:

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Όταν είναι εφικτό, υπολογίστε τις μέσες τιμές απορρόφησης του ορού διπλού μάρτυρα. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

- απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200
- A του αρνητικού μάρτυρα < 10 % του A του θετικού μάρτυρα
- A κενό έναντι αέρα < 0,350

Οι έλεγχοι ποιότητας των τρεχουσών παρτίδων δημοσιεύονται στην ιστοσελίδα μας: www.bordier.ch.

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. Η απορρόφηση διακοπής ενός δείγματος ορίζεται, μετά την αφαίρεση του χωρίς κενό ορού, ως εξής:

$$\text{Δείκτης} = \frac{\text{Δείγμα απορρόφησης}}{\text{Ορός διακοπής απορρόφησης}}$$

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερος από **1,0**. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων *Leishmania infantum* είναι κλινικώς μη σημαντική.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερος από **1,0**. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι διαλυτών αντιγόνων *Leishmania infantum* είναι κλινικώς σημαντική. Υποδεικνύει ότι ο ασθενής είχε έρθει σε επαφή με το παράσιτο.

Μία γκρίζα ζώνη θα μπορούσε να οριστεί από κάθε εργαστήριο ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών του. Σε περίπτωση οριακών ή αμφίβολων αποτελεσμάτων, σας συνιστούμε να επαναλάβετε τη δοκιμή 2-4 εβδομάδες αργότερα, με ένα νέο δείγμα.

Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Εντοπίστηκε ευαισθησία 93% με 29 ορούς σε ανοσοεπαρκείς ασθενείς (HIV-) που πάσχουν από σπλαχνική λείσμανιάση λόγω *L. infantum*. Εντοπίστηκε ευαισθησία 67% με 21 ορούς για ασθενείς με ταυτόχρονη λοίμωξη HIV-*Leishmania*. Ενδέχεται να προκύψει αρνητική 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*. Εντοπίστηκε εξειδίκευση 100% με 99 ορούς αιμοδοτών (Ελβετικοί).

Παρεμβάσεις:

Η εσωτερική αξιολόγηση έδειξε ότι οι αιμορραγικοί, λειμικοί ή ικτερικοί οροί δεν παρεμβαίνουν στα αποτελέσματα της δοκιμής.

Ακρίβεια:

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

Περιορισμοί:

Εντοπίστηκε εξειδίκευση 100% με 15 ορούς ασθενών με άλλες παρασιτικές λοιμώξεις. 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 διάγνωση μιας μολυσματικής νόσου δεν θα πρέπει να καθοριστεί βάσει ενός ενιαίου αποτελέσματος των δοκιμών. Η ακριβής διάγνωση θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ενδημική κατάσταση, το κλινικό ιστορικό, τη συμπτωματολογία, την απεικόνιση καθώς και τα ορολογικά δεδομένα.

Σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και στα νεογνά τα ορολογικά δεδομένα έχουν περιορισμένη αξία.

Αναφορές:

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

