

LEISHMANIA INFANTUM

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej viscerálnej leishmaniózy

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie

Návod na použitie pre artikel č. **9500**
EC reg. zn.: H-CH/CA01/IVD/01756



Plánované použitie:

Súprava Bordier *Leishmania infantum* ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Leishmania infantum* v ľudskom. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky.

Pozadie:

Leishmanióza je bacilonosičná choroba prenášaná kútovkami. Infekcia sa vyskytuje u rôznych druhov povinných intracelulárnych protozoí rodu *Leishmania*. Ľudská infekcia je spôsobená asi 21 z 30 druhov, o ktorých je známe, že infikujú cicavce. Najčastejšími chorobami sú kožná leishmanióza, ktorá spôsobuje kožné ochorenia a viscerálnu leishmaniózu, ktorá postihuje zvyčajne slezinu, pečeň a kostnú dreň. Medzi hlavné príznaky patrí horúčka, zväčšená slezina a kožné ochorenia. Diagnóza viscerálnej leishmaniózy je založená na pozitívnom výsledku sérologických testov a pozitívnej PCR na aspirátoch kostnej drene alebo biopsii kože.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných mikrotitračných platničkách senzitivovaných rozpustnými antigénmi promastigotov *Leishmania infantum*. Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalického fosfatázy. Druhý premývacie krok odstráni nenaštievaný konjugát. Odhalenie nenaštievaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalického fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Leishmania infantum* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrododštičiek ELISA.

Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	9500-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi promastigotov <i>Leishmania infantum</i>	96	jamky
DILB	9500-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
WASH	9500-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	9500-05	Zastavovací roztok (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
CONTROL +	9500-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
CONJ	9500-09	Proteín A - konjugát alkalického fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
SUBS	9500-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8°C (preprava pri teplote okolia), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 9500-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysušacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 9500-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 9500-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalické fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Kontrolné séra: rozriedte 10 µl kontrolných sér 9500-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

Konjugát: rozriedte konjugát 9500-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

Roztok substrátu: rozpustite tablety substrátu fosfatázy 9500-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 9500-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

Zastavovací roztok: použite reagent 9500-05, nezriedený.

Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladujte pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu.

Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN ₃)	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	9500-02	0.1 %	0.02 %
Premývací roztok (10 x)	9500-03	0.05 %	/
Premývací roztok	9500-04	0.01 %	/
Kontrolné séra (20 x)	9500-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Konjugát (50 x)	9500-09	0.1 %	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (9500-06 až -08) sú z psi.
- Zaobchádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.

Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 μ l tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 μ l zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 μ l každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 μ l premývacieho roztoku.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 μ l zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 μ l premývacieho roztoku.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 μ l roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 μ l zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 10 % A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: www.bordier.ch.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 9500-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov leishmaniózy a zdravým ľudským sérom. Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom promastigotov *Leishmania infantum* klinicky zanedbateľná. Výsledok je **pozitívny**, keď je index analyzovanej vzorky vyšší ako 1,0. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom promastigotov *Leishmania infantum* považovaná za klinicky významnú. Znamená to, že pacient mal kontakt s parazitom.

Každé laboratórium môže definovať sivú zónu podľa populácie pacientov. V prípade hraničných alebo pochybných výsledkov odporúčame zopakovať test o 2 až 4 týždne s čerstvou vzorkou.

Citlivosť a presnosť:

Bola zistená citlivosť 93% v 29 sérach pacientov u imunokompetentných pacientov (HIV) trpiacich viscerálnou leishmaniózou spôsobenou *L. infantum*. Bola zistená citlivosť 67% v 21 sérach pacientov infikovaných aj HIV aj parazitom *Leishmania*. Negatívna sérológia a pozitívna kultivácia sa pri týchto pacientoch môžu vyskytnúť pokiaľ sú to pacienti s potlačenou imunitou alebo sú infikovaní inými druhmi parazitu *Leishmania*, ako *L. major* alebo *L. braziliensis*.

Presnosť s výškou 100% sa vyskytla pri 99 sérach darcov krvi (švajčiarskych).

Interferencie:

Vnútorne hodnotenie ukázalo, že hemoragické, lipemické alebo ikterické séra neinterferujú s výsledkami testu.

Precíznosť:

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	1.005	1.766	1.381	2.187
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.061	0.086	0.097	0.114
Variačný koeficient (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Obmedzenia:

Zistila sa presnosť 100% u 15 sér pacientov s inými parazitickými infekciami. Krížová reaktivita sa môže vyskytovať v niektorých iných parazitárnych infekciách, ako je africká trypanosomiáza, Chagasova choroba a kožná a mukokutánna leishmanióza.

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

Odkazy na použitú literatúru:

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

