

# LEISHMANIA INFANTUM

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus visceralinei leišmaniozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 9500

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756

## Naudojimo paskirtis:

Serologinei visceralinės leišmaniozės diagnozei (IgG). Seroepidemiologiniams tyrimams. Serologinei ŽIV pacientų iš endeminių zonų kontrolei. Poterapinei ŽIV-Leišmanijos ko-infekuotų pacientų kontrolei.

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Leishmania infantum* tirpiaisiais antigenais, atlikimui. Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

<b>WELL</b>	9500-01	Laužomos ELISA juostelės su <i>Leishmania infantum</i> tirpiaisiais antigenais	96	šulinėliai
<b>DILB</b>	9500-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	9500-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9500-04	Fermento buferis	50	ml
<b>STOP</b>	9500-05	Stabdomasis tirpalas (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9500-06	Neigiamas kontrolinis serumas	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9500-07	Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė)	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9500-08	Teigiamas kontrolinis serumas	200	μl
<b>CONJ</b>	9500-09	Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas	300	μl
<b>SUBS</b>	9500-10	Fosfatazės substratas	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rémelis – ELISA 8-šulinėlių laikikliams	1	vienetas

## Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°- 8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

## Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

## Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

**ELISA šulinėliai:** atidaryti folinio maišelio 9500-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

**Skiedimo buferis:** praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9500-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

**Plovimo tirpalas:** praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9500-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9500-06 – 9500-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

**Tiriamas serumas:** praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 9500-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

**Substrato tirpalas:** atšildyti fermento buferį 9500-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9500-10 nepraskiestame buferyje 9500-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

**Stabdomasis tirpalas:** reagentą 9500-05 naudoti neskietą.



**Įspėjimai ir atsargumo priemonės:** Tirpalai 9500-02, 9500-03, 9500-04 ir 9500-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido ( $N_3Na$ ). Tirpalas 9500-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 9500-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9500-06 – 9500-08) yra iš triušių.

## Reikalingi tūriai:

			Naudojamų šulinėlių skaičius			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Skiedimo buferis (10 x)</b>	9500-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Plovimo tirpalas (10 x)</b>	9500-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Konjugatas</b>	9500-09 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Kontrolinis serumas</b>	9500-06 to -08 + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Tiriamas serumas</b>	Serumas + skiedimo buferis	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Substrato tirpalas</b>	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## Procedūra:

### 1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

### 2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės šulinėlį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 µl kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 µl).

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

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

### 3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

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

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

### 4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

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

Sustabdyti reakciją į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

### 5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

## Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 15% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo (ribinio) serumo 9500-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo leišmaniozės ir sveiko žmogaus serumų.

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra žemesnė už silpnai teigiamo serumo 9500-07 absorbciją. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš *Leishmania infantum* tirpiasis antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio absorbcija yra aukštesnė už silpnai teigiamos kontrolės 9500-07 absorbciją. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prieš *Leishmania infantum* tirpiasis antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

## Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

Testo jautrumas yra didesnis nei 95% imunokompetentiniams pacientams, kenčiantiems nuo visceralinės leišmaniozės, sukeltos *L. infantum*. ŽIV-*Leishmania* ko-infekuotiems pacientams testo jautrumas yra 60-85%. Neigiami serologiniai ir teigiamos kultūros rezultatai gali būti gaunami pacientams imunosupresiniams ar infekuotiems su kitomis *Leishmania* rūšimis, tokiomis kaip *L. major* ar *L. braziliensis*.

Testo specifiškumas yra didesnis nei 95% su šveicarų kraujo donorų serumais. Kryžminis reaktyvumas gali įvykti su kai kuriomis parazitinėmis infekcijomis, tokiomis kaip Afrikos tripanosomiazė, Čiango liga ir odos ir mukokutaninė leišmaniozė. Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikeriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

**Su šiuo rinkiniu ir tokiomis pačiomis sąlygomis gali būti testuojamas šuns serumas.**

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius 24 šulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

	Atsikartojamumas		Atkuriamumas	
	Mėginys 1	Mėginys 2	Mėginys 1	Mėginys 2
<b>Vidurkis (absorbcija)</b>	1.005	1.766	1.381	2.187
<b>Standartinis nuokrypis (absorbcijos)</b>	0.061	0.086	0.097	0.114
<b>Pokyčio koeficientas (%)</b>	6.1	4.9	7.1	5.2

## Literatūros šaltiniai:

**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. Feuillet 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

