

# LEISHMANIA INFANTUM

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus filariazei nustatyti

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 9500  
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756



## Naudojimo paskirtis:

Bordier Leishmania infantum ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš *Leishmania infantum* žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas.

## Kilmė:

Leišmaniozė tai pernešamoji liga, kurią perneša moskitai. Infekciją perneša įvairios intraląstelinės *Leishmania* genties rūšys. Žmonių infekciją sukelia apie 21 iš 30 žinomų žinduolių infekcijos rūšių. Dažniausiai paitaikančios ligos formos yra odos leišmaniozė, kuri sukelia odos sutrikimus, ir visceralinė leišmaniozė, kuri paprastai veikia blužnį, kepenis ir kaulų čiulpus. Pagrindiniai simptomai: karščiavimas, padidėjusi blužnis ir odos pažeidimai. Visceralinės leišmaniozės diagnozavimas pagrįstas teigiamais serologinių tyrimų rezultatais ir teigiama kaulų čiulpų PGR arba odos biopsija.

## Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) lauko omuose mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Leishmania infantum* tirpiaisiais antigenais, atlikimui. Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių parazitinių antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintos nesurištos konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Leishmania infantum* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

<b>WELL</b>	9500-01	Lauko omos ELISA juostelės su <i>Leishmania infantum</i> tirpiaisiais antigenais	96	ulinėliai
<b>DILB</b>	9500-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	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 (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	9500-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	9500-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
<b>CONTROL +</b>	9500-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
<b>CONJ</b>	9500-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
<b>SUBS</b>	9500-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

### **Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:**

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutėsono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilus iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

### **Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:**

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

### **Reagentų paruoimas prieš naudojimą:**

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio mai elio 9500-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruo tus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, uždėdyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. I naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

**Skiedimo buferis:** praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9500-02 distiliuotu vandeniū santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Plovimo tirpalas:** praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 9500-03 distiliuotu vandeniū santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 9500-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

**Konjugatas:** praskiesti konjugatą 9500-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

**Substrato tirpalas:** ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 9500-10 neskiestame fermento buferyje 9500-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

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

### **Mėginių surinkimas ir paruoimas:**

Naudoti ūmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomas 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar ūemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

### **Įspėjimai ir atsargumo priemonės:**

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	9500-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	9500-03	0,05 %	/
Fermento buferis	9500-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	9500-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	9500-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9500-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (9500-06 iki -08) yra iš šuo.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

### **Atliekų alinimas:**

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

### **Procedūra:**

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

#### **1 žingsnis: Blokavimas:**

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

#### **2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:**

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

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

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

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

#### **3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:**

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

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

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

#### **4 žingsnis: Inkubacija su substratu:**

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

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

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

#### **5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:**

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

### **Interpretacija:**

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 10 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prieš orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

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

Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra žemesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Leishmania infantum* tirpius antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie *Leishmania infantum* tirpius antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

Tai rodo, kad pacientas turėjo kontaktą su parazitu.

Kiekvienoje laboratorijoje gali būti apibrėžta pilkoji zona priklausomai nuo pacientų populiacijos. Jei rezultatai yra tarpiniai ar keliantys abejonių, rekomenduojame pakartotinai atlikti testą po 2-4 savaičių su nauju mėginiu.

### Jautrumas ir specifiškumas:

93% jautrumas nustatytas testuojant 29 pacientų serumų su (ŽIV-) visceralinės leišmaniozės *L. infantum*. 67% jautrumas nustatytas testuojant 21 paciento serumų infekuotų ŽIV-*Leishmania*. Neigiamas serologinis rezultatas ir teigiamas tyrimo rezultatas gali būti pacientams, kuriems yra slopinama imuninė sistema arba užsikrėtusiems kitos *Leishmania* rūšies, tokios kaip *L. major* ar *L. braziliensis* infekcija. 100% specifiškumas nustatytas, testuojant 99 kraujo donorų serumų (šveicarų).

### Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipemini ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

### Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių 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

### Apribojimai:

100% specifiškumas nustatytas testuojant 15 pacientų serumų su kitomis parazitinėmis infekcijomis. Kryžminis reaktyvumas gali pasireikšti kai kuriose kitose parazitinėse infekcijose, tokiose kaip afrikinis trypanosomozas, Chagos liga, odos ir gleivinės leišmaniozės.

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

### Literatūros altiniai:

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

