

LEISHMANIA INFANTUM

Enzymatický imunologický test pro diagnózu viscerální leishmaniózy

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. **9500**
Reg. č. ES: H-CH/CA01/IVD/01756



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) viscerální leishmaniózy. Séro-epidemiologické průzkumy. Sérologická kontrola pacientů s HIV pro endemické oblasti. Post terapeutická kontrola pacientů nakažených HIV a zároveň leishmaniózou.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících rozpustné promastigotní antigeny *Leishmania infantum*. Přítomnost konkrétních protilátek parazita v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	9500-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující rozpustné antigeny <i>Leishmania infantum</i>	96	destiček
DILB	9500-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	9500-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	9500-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	9500-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	9500-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	9500-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	9500-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 9500-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: zředte koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 9500-02 v destilované vodě v poměru 1/10.

Vyplachovací roztok: zředte koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 9500-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zředte 10 μ l kontrolního séra 9500-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zředte 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zředte konjugát 9500-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 9500-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpusťte tablety substrátu fosfatázy 9500-10 v nezředěném tlumicím roztoku 9500-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 9500-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 9500-02, 9500-03, 9500-04 a 9500-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 9500-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (9500-06 až -08) pochází z psi.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	9500-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	9500-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	9500-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	9500-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Postup:

Krok 1: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 15% A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s meznou hodnotou) 9500-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů leishmaniózy a sérem zdravých lidí.

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než absorbance slabě pozitivního séra 9500-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Leishmania infantum* klinicky nevýznamná.

Výsledek je **pozitivní**, když je absorbance analyzovaného vzorku vyšší než absorbance slabě pozitivního séra 9500-07. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti rozpustným antigenům *Leishmania infantum* považována za klinicky významnou.

Citlivost a specificita analýzy:

Citlivost testu je vyšší než 95 % u imunokompetentních pacientů trpících viscerální leishmaniózou způsobenou *L.infantum*. Pro pacienty trpící zároveň HIV i *Leishmania* je citlivost testu mezi 60 a 85 %. Negativní sérologie a pozitivní kultura se mohou vyskytnout u těchto pacientů, když mají potlačenou imunitu nebo jsou nakaženi jiným druhem *Leishmania*, např. *L. major* nebo *L. braziliensis*.

Specificita testu je lepší než 95 % u séra od švýcarských dárců krve. Příčná reaktivita se může vyskytnout u některých dalších parazitických infekcí, např. africká trypanosomiáza, Chagasova choroba a kožní a sliznicová leishmanióza. Interní vyhodnocení ukázalo, že hemoragické, lipemické nebo ikterické sérum nenarušuje výsledky testu.

Psí sérum lze testovat pomocí této sady za stejných podmínek.

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze. Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (absorbance)	1,005	1,766	1,381	2,187
Standardní odchylka (absorbance)	0,061	0,086	0,097	0,114
Koeficient odchylky (%)	6,1	4,9	7,1	5,2

Reference:

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.

Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

