

Leishmania infantum IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus leišmaniozės nustatyti

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



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Naudojimo instrukcija produktui N° 9500
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prie *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 moskita. Infekciją perneša įvairios intraląstelinės *Leishmania* genties rūšys. Žmonių infekciją sukelia apie 21 iš 30 žinomų žinduolių infekcijos rūšių. Dažniausiai paitaiknčios 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) laukuose mikrotitravimo šulinėliuose, kurių sienelės padengtos *Leishmania infantum* somatiniais promastigoto 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 pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėdant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Leishmania infantum* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelių skaitytuvą.

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

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	9500-01	Laukoms ELISA juostelės su <i>Leishmania infantum</i> somatiniais promastigoto antigenais	96	ulinėliai
DILB	9500-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	9500-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	9500-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	9500-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	9500-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	9500-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	9500-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- šulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine vieta. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės ono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs 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 sklavavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir ištirinti.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maielio 9500-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į dėmelį teisinga kryptimi. Ištirinti sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 9500-02 distiliuotu vandeniu 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 vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatázės 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 fosfatázės substrato tabletę(es) 9500-10 neskiestame fermento buferyje 9500-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maiyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik šiek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti iš dalies hidrolizuotas, todėl reikia išmesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 9500-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatšildykite bandinių pakartotinai. Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Įspėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiški junginiai atsiranda naudojant šią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₃ N ₃)	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 nekeltų jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 9500-05 (0,5 M K₃PO₄) 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.
- Nemaityti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su šio rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užteršimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje www.bordier.ch.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis šalies 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 iš siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėlį (mėginį be serumo).

Į kitus tris iš 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 ulinėlį (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 ulinėlį.

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

Sustabdyti reakciją į kiekvieną ulinėlį 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 stabdomo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę išvisų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutinės absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 10% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: 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 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* antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

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

Jeigu rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

Analitiniai pasirodymai:

Analitinis specifiškumas:

100% specifiškumas nustatytas 15 pacientų, sergančių kitomis parazitinėmis infekcijomis, serumuose. Kryžminis reaktyvumas gali atsirasti sergant kai kuriomis kitomis parazitinėmis infekcijomis, tokiomis kaip afrikinė tripanosomozė, Čagaso liga ir odos bei gleivinės leišmaniozė.

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

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
Vidurkis (absorbicija)	1,005	1,766	1,381	2,187
Standartinis nuokrypis (absorbicijos)	0,061	0,086	0,097	0,114
Pokyčio koeficientas (%)	6,1	4,9	7,1	5,2

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijiškumas

Klinikiniai pasirodymai:

Diagnostinis jautrumas:

93% jautrumas buvo nustatytas 29 imunokompetentingų pacientų (ŽIV-), sergančių *L. infantum* sukelta visceraline leišmanioze, serumuose. 21 ŽIV *leišmanioze* koinfektuoto paciento serume nustatytas 67% jautrumas. Šiems pacientams gali būti neigiama serologija ir teigiama kultūra, kai jie yra susilpnėję arba užsikrėtę kitomis *leišmaniozės* rūšimis, tokiomis kaip *L. major* arba *L. braziliensis*.

Diagnostikos specifiškumas:

99 kraujo donorų serumuose (Šveicarija) nustatytas 100% specifiškumas.

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Pirmiau minėtai ŽIV- populiacijai nustatytas 100% PPV ir 98% NPV, o aukščiau minėtai ŽIV+ populiacijai - 100% ir 93%.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje 99 Šveicarijos kraujo donorų populiacijoje numatoma Indekso vertė yra 0,39. Paveiktoje 13 pacientų, sergančių visceraline leišmanioze, serumų populiacijoje numatoma Indekso vertė yra 2,64.

Incidentai:

Apie bet kokį rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

Apribojimai:

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 šaltiniai:

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Lepout, 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.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. **116**: 193-19

Lévêque, M.F., Battery, E., Delaunay, P., Lmimouni, B.E., Aoun, K., L'Ollivier, C., et al. (2020) Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis **14** : e0008139.



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

