

# Leishmania infantum IgG ELISA

Imunološko određivanje enzimima za dijagnozu ljudske lišmanioze

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Upute za upotrebu za br. artikla **9500**  
UDI-DI: 07640158219508



## Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA namijenjen je za kvalitativno prepoznavanje antitijela protiv parazita *Leishmania infantum* u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda.

## Pozadina:

Lišmenioza je bolest koju prenose pješčane mušice i koja se prenosi vektorima. Zarazu uzrokuju različite vrste obligatnih unutarstaničnih praživotinja roda *Leishmania*. Ljudsku zarazu uzrokuje oko 21 od 30 vrsta za koje je poznato da inficiraju sisavce. Najčešći su oblici bolesti kutana lišmenioza koja uzrokuje kožne poremećaje i visceralna lišmenioza koja u pravilu pogađa slezenu, jetra i koštanu srž. Glavni su simptomi vrućica, povećana slezena i kutane afekcije. Dijagnoza visceralne lišmenioze temelji se na pozitivnom rezultatu dobivenom serološkim testiranjem i pozitivnim PCR testom na aspiratima koštane srži ili biopsijama kože.

## Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranih s somatskim promastigotskim antigeni *Leishmania infantum*. Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost parazitskih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Leishmania infantum* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA. Test je ručni, ali se može provesti automatskim sustavima, koje korisnik mora potvrditi.

## Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

|                    |         |                                                                                                           |     |         |
|--------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------|
| <b>WELL</b>        | 9500-01 | Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <b><i>Leishmania infantum</i></b> somatski promastigotni antigeni | 96  | jažica  |
| <b>DILB</b>        | 9500-02 | Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto                                              | 50  | ml      |
| <b>WASH</b>        | 9500-03 | Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)                                                                    | 50  | ml      |
| <b>ENZB</b>        | 9500-04 | Enzimski pufer                                                                                            | 50  | ml      |
| <b>STOP</b>        | 9500-05 | Otopina za zaustavljanje (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )                                           | 25  | ml      |
| <b>CONTROL -</b>   | 9500-06 | Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep                                                              | 200 | μl      |
| <b>CONTROL -/+</b> | 9500-07 | Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep                                                 | 200 | μl      |
| <b>CONTROL +</b>   | 9500-08 | Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep                                                              | 200 | μl      |
| <b>CONJ</b>        | 9500-09 | Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep                                             | 300 | μl      |
| <b>SUBS</b>        | 9500-10 | Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)                                                                | 20  | tableta |
|                    |         | Spremnik s više pipeta, 25 ml                                                                             | 1   | komad   |
|                    |         | Okvir za držač za 8 jažica ELISA                                                                          | 1   | komad   |

## Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet između +2°C i +8°C (transport potvrđen između -20°C i +37°C tijekom 21 dana), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i broj serije kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi između +2°C i +8°C.

## Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na +37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

### Priprema reagensa prije upotrebe:

Sve reagense ostavite na temperaturi između +20°C i +30°C najmanje 1 sat i promiješajte prije upotrebe.

**Jažice ELISA:** otvorite bočni dio aluminijske vrećice 9500-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

**Pufer za razrjeđivanje:** razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 9500-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

**Otopina za ispiranje:** razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 9500-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

**Kontrolni serumi:** razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 9500-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

**Konjugat:** razrijedite konjugat 9500-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

**Otopina supstrata:** otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 9500-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 9500-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

**Otopina za zaustavljanje:** upotrijebite nerazrijeđeni reagens 9500-05.

### Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum treba čuvati na temperaturi između +2°C i +8°C ako se test izvede unutar 7 dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje.

Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml). Nemojte čuvati razrijeđeni uzorak.

### Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

| Komponenta                    | Referenca      | Natrijev azid ( $\text{NaN}_3$ ) | Mertiolat |
|-------------------------------|----------------|----------------------------------|-----------|
| Pufer za razrjeđivanje (10 x) | 9500-02        | 0,1%                             | 0,02%     |
| Otopina za ispiranje (10 x)   | 9500-03        | 0,05%                            | /         |
| Enzimski pufer                | 9500-04        | 0,01%                            | /         |
| Kontrolni serumi (20 x)       | 9500-06 do -08 | 0,1%                             | 0,02%     |
| Konjugat (50 x)               | 9500-09        | 0,1%                             | /         |

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

| Komponenta               | Opasna komponenta        | Opasnosti piktogram                                                                 | Oznaka opasnosti           | Izjava o mjerama opreza                                                                                                                                                                 |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Otopina za zaustavljanje | kalijev fosfat, trobazni |  | Uzrokuje teške ozljede oka | Nositi zaštitu za oči.<br>U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: Oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. |

- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9500-06 do -08) su životinjskog podrijetla (psi) i s njima se mora pažljivo rukovati.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense različite broj serije ni kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.

- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

### Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

### Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

#### 1. Korak: Predinkubacija:

Napunite jažice s 250 µl otopine pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 do 15 minuta između +20°C i +30°C.

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

#### 2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka, preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

#### 3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

#### 4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

#### 5. korak: Mjerenje apsorpcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorpcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

### Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorpcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorpcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 10% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 8% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

U slučaju da uzorak daje signal koji prelazi raspon mjerenja čitača mikropločice, treba dodijeliti vrijednost koja odgovara gornjem rasponu mjerenja čitača

Kontrole kvalitete trenutačnih serija objavljene su na našem web-mjestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 9500-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva lišmanioze i zdravih ljudskih seruma.

Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **1,0**. U ovom je slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Leishmania infantum* klinički beznačajna.

Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka veći ili jednak **1,0**. U ovom se slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Leishmania infantum* smatra klinički značajnom. To označava da je bolesnik bio u dodiru s parazitom.

Svaki laboratorij može definirati sivu zonu u skladu sa svojom bolesničkom populacijom. U slučaju graničnih ili sumnjivih rezultata, preporučujemo ponavljanje testa nakon 2 - 4 tjedna upotrebom svježeg uzorka.

U slučaju sumnjiva rezultata, preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

## Analitički rezultati:

### Analitička specifičnost:

Specifičnost od 100% pronađena je u 15 seruma bolesnika s drugim oblicima parazitskih infekcija. Unakrižna reaktivnost može nastupiti kod nekih drugih parazitskih zaraza kao što su afrička tripanosomijaza, Chagasova bolest te kutana i mukokutana lišmenioza.

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

### Preciznost:

Ponovljivost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma duplikatu u 10 različitim testova.

|                                    | Ponovljivost |           | Reproducibilnost |           |
|------------------------------------|--------------|-----------|------------------|-----------|
|                                    | 1. uzorak    | 2. uzorak | 1. uzorak        | 2. uzorak |
| Prosjeak (apsorpcija)              | 1,005        | 1,766     | 1,381            | 2,187     |
| Standardno odstupanje (apsorpcija) | 0,061        | 0,086     | 0,097            | 0,117     |
| Koeficijent varijacije (%)         | 6,1          | 4,9       | 7,0              | 5,3       |

## Klinički rezultati:

### Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 93% pronađena je u 29 seruma od imunokompetentnih (HIV-) pacijenata koji boluju od visceralne lišmenioze čiji je uzrok *L. infantum*. Osjetljivost od 67% pronađena je u 21 serumu od bolesnika koji su HIV pozitivni i također boluju od lišmenioze. Negativna serologija i pozitivna kultura mogu nastupiti u tih bolesnika kada su imunosupresirani ili zaraženi drugim vrstama *Leishmania* kao što su *L. major* ili *L. braziliensis*.

### Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 100% pronađena je u 99 seruma (švicarskih) darivatelja krvi.

### Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

Pozitivna predvidljiva vrijednost (PPV) od 100% i negativna predvidljiva vrijednost (NPV) od 98% pronađeni su u spomenutoj HIV negativnoj populaciji te od 100% i 93 % u spomenutoj HIV pozitivnoj populaciji.

### Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 99 švicarskih darivatelja krvi, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,39. U pogođenoj populaciji od 13 seruma od bolesnika koji boluju od visceralne lišmenioze, očekivana indeksna vrijednost iznosi 2,64.

## Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

## Ograničenja:

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

## Reference:

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.

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 S.A.**  
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.  
+41 21 566 17 18    [cb@bordier.ch](mailto:cb@bordier.ch)    [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

