

# 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**  
Reg. Br. EZ-a: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



## Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA namijenjen je za kvantitativno 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 se može provesti automatskim sustavima, no to mora potvrditi korisnik.

## Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

<b>WELL</b>	9500-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane sa <i>Leishmania infantum</i> 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 na temperaturi od 2 °C do 8 °C (transportirajte na okolnoj temperaturi), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i LOT broj kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi od 2°C do 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:

Osigurajte da svi reagensi budu na sobnoj temperaturi i pomiješajte ih 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 od 2°C do 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 od 2°C do 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 od 2°C do 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 se treba čuvati na temperaturi od 2°C do 8°C ako će se analizirati unutar nekoliko 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).

## Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	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.

- Otopina za zaustavljanje 9500-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ima nadražujuć učinak.
- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (9500-06 do -08) potječu od pas.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense ni različite LOT brojeve 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: Blokiranje:

U cijelosti napunite jažice otopinom pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 – 15 minuta na sobnoj temperaturi (blokiranje).

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.

Kontrole kvalitete trenutačnih LOT brojeva 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 viši od **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 procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 10 različitih testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjek (apsorpcija)	1,005	1,766	1,381	2,187
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,061	0,086	0,097	0,114
Koeficijent varijacije (%)	6,1	4,9	7,1	5,2

Sljedeći rezultati ne mogu se procijeniti jer ne postoji potvrđeni referentni materijal za tu analizu:

- analitička osjetljivost (ograničenja prepoznavanja i kvantizacije)
- točnost
- istinitost
- mjerni raspon
- linearnost.

## 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 SA

Biokema Building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Švicarska.

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

