

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ВИСЦЕРАЛЬНОМУ ЛЕЙШМАНИОЗУ (LEISHMANIA)

**8203-29, Leishmania**

Каталог. № : 8203-29

Методика от 25-06-2008

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

## ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Для качественного определения в первую очередь IgG антител в сыворотке людей к висцеральному лейшманиозу с использованием методики твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ АНАЛИЗА

Висцеральный лейшманиоз (ВЛ) - серьезная болезнь с высокой смертностью, вызванная паразитами комплекса *L. donovani*. Способ передачи – летящий песок, носителями инфекции обычно являются собаки. Эта болезнь эндемическая для многих стран и есть серьезной проблемой

Во многих развивающихся странах, особенно с увеличивающейся урбанизацией населения. Лобшое количество случаев наблюдается в латинской Америке, восточной Африке, среднем Востоке Индии и Китае. Она эндемическая для стран, граничащих с Средиземноморьем. Такими как Италия, южная Франция, Испания, Португалия и северная Африка. В южной Европе ВЛ стал основной условно-патогенной инфекцией в пациентов, больных СПИДом.

Диагностика острого ВЛ часто проводится аспирацией костного мозга для прямой идентификации паразита. Процедура агрессивна, болезненна, опасна и имеет низкую долю успеха исходя из неспособности всегда изолировать паразиты от ткани. Как вариант, серодиагностика широко используется поскольку антилейшманиальные титры антител обычно высоки в течение периода острого заболевания. ELISA - привилегированный лабораторный анализ для серодиагностики ВЛ, хотя не прямые иммунофлуоресцентные анализы антител (IFAT) и прямые агглютинационные анализы (DAT), используя целые паразиты, являются все еще широко использованными в сочетании с ELISA или в одиночку.

## ПРИНЦИП ПРОЦЕДУРЫ

В течение первой инкубации антитела сыворотки пациентов связываются с антигенами в анализируемой лунке. Последующая инкубация позволяет ферментному комплексу связаться с комплексом антиген-антител. После нескольких промывок для удаления несвязанных ферментов добавляется субстрат, который в присутствии ферментного комплекса и перекиси образует синий цвет. Стоп раствор останавливает реакцию, превращая синий цвет в желтый.

## РЕАГЕНТЫ

Позиция	Описание
Полоски для анализа	Микролуночки, содержащие антигены <i>Leishmania</i> - 96 лунок в рамке для полосок.
Ферментный конъюгат:	1 бутылка с 11 мл анти-человеческой Ig пероксидазы (HRP) в стабилизирующем буфере с тимеросалом.
Положительный контроль	1 флакон с 1 мл разбавленных <i>Leishmania</i> -положительных сывороток в буфере с тимеросалом.
Отрицательный контроль	1 флакон с 1 мл разбавленных <i>Leishmania</i> -отрицательных сывороток в буфере с тимеросалом.
Хромоген	1 бутылка с 11 мл хромогена тетраметилбензидаина (ТМВ).
Промывочный концентрат (20x)	1 бутылка с 25 мл концентрированного буфера и поверхностно-активного вещества с тимеросалом.
Буфер для разбавления	2 бутылки с 30 мл раствора буферизованного белка с тимеросалом.
Стоп раствор	1 бутылка с 11 мл 1М фосфорной кислоты.

## ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Контроли и буфер разбавления – основанные на казеине буферы и кажутся мутными. Кроме того, на дне флакона может развиваться желатиновый слой. Это нормально и не влияет на анализ.

Промывочный концентрат может кристаллизоваться после хранения при 4°C. Кристаллизация исчезает после разбавления до рабочего состояния.

Не используйте сыворотку, которая, возможно, использовалась для поддержки роста микроорганизмов, или мутную сыворотку исходя из насыщенного содержания липидов. Образцы с высоким содержанием липидов должны быть перед использованием очищены.

Не добавлять в образцы или в любые реагенты азиды.

Контроли и некоторые реагенты содержат тимеросал в качестве консерванта.

Обращайтесь со всеми сыворотками как будто с инфекционными.

Отрицательный контроль был проверен необходимыми методами и оказался отрицательным к поверхностному антигену гепатита В и к ВИЧ антителам. Так как никакое испытание не может предоставить полной гарантии, что возбудителей инфекций нет, это изделие должно использоваться в соответствующих безопасных условиях, которые бы использовались при любых потенциальных возбудителях инфекций.

## УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

Реагенты, полоски и компоненты в бутылках:

Хранить при 2-8°C.

Гибкая бутылка с разбавленным промывочным буфером может храниться при комнатной температуре.

## ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Промывочный буфер – снимите колпачок и добавьте содержимое бутылки к 475 мл дистиллированной воды. Перенесите разбавленный промывочный буфер в гибкую бутылку.

Замечание: промывки состоят из заполнения до края каждой лунки, вытряхивания содержимого и обратного заполнения.

Избегать образования пузырьков в лунках в течение этапов промывки.

Анализируемые образцы: Проведите разбавление сывороток пациентов 1:40 с помощью буфера для разбавления.

## СБОР И ПОДГОТОВКА СЫВОРОТКИ

- Коагулируйте кровь и удалите сыворотку. Заморозьте образец до -20°C или ниже если он не используется сразу.
- Не инактивируйте сыворотку теплом.
- Избегайте повторного замораживания и размораживания образцов.

## МАТЕРИАЛЫ

### Поставляемые материалы

Микролуночный серологический ELISA набор висцеральной лейшмании.

### Требуемые, но не поставляемые материалы

- Пипетки.
- Гибкая бутылка для промывки полосок.
- Дистиллированная вода.
- ELISA спектрофотометр для считывания планшетов с фильтром 450/620-650 нм (выборочно, результаты могут считываться визуально).
- Пробирки для разбавлений сыворотки.

## ПРОЦЕДУРА

1. Отломить требуемое количество лунок (две для контролей и определенного количества образцов) и положить в рамку для полосок.
2. Добавить 100 мкл отрицательного контроля в лунку #1, 100 мкл положительного контроля в лунку #2 и 100 мкл разбавленных (1:40) образцов для анализа в остальные лунки.  
**Замечание:** Отрицательный и положительный контроли поставляются разбавленными. Не разбавить.
3. Инкубировать при комнатной температуре (15 - 25°C) в течении 10 минут.
4. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза с разбавленным промывочным буфером \*.
5. Добавить в каждую лунку по 2 капли ферментного конъюгата.
6. Инкубировать при комнатной температуре в течении 10 минут.
7. Вытряхнуть содержимое и промыть 3 раза промывочным буфером.
8. Добавить в каждую лунку по 2 капли хромогена.
9. Инкубировать при комнатной температуре в течении 5 минут.
10. Добавить по 2 капли стоп раствора.

11. В рабочем состоянии установить на нуль планшетный считыватель ELISA, считайте лунки при 450 нм с референтным фильтром при 620-650 нм или считать результаты визуально.

\* Промывки состоят из использования разбавленного промывочного буфера для заполнения до края каждой лунки, вытряхивания содержимого и обратного заполнения лунок в общем количестве 3 раза.

Избегайте образования пузырьков в лунках в течение этапов промывки.

Контроли должны быть включены во время каждой процедуры.

#### ОГРАНИЧЕНИЯ АНАЛИЗА

Результаты анализа сывороток должны использоваться как вспомогательное средство в диагностике и не должны интерпретироваться как сам диагноз.

Хотя и до сих пор не было зафиксировано специфических перекрестных реакций, взаимодействия с аналогичными организмами не следует исключать.

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

##### Спектрофотометр:

В рабочем режиме установите на нуль планшетный считыватель ELISA. Считайте все лунки, используя бихроматическое считывание с фильтрами в 450 и 620-650 нм.

**Положительный** - мера поглощения света считывания больше или равна 0.2 единицы ОП.

**Отрицательный** - мера поглощения света считывания меньше чем 0.2 единицы ОП.

##### Визуальный

Образец должен интерпретироваться как положительный, если степень цветного развития очевидна и значительна.

Рабочие характеристики			
		Иммунофлуоресцентный	
		+	-
ДАИ	+	30	10
	-	1	53

**Чувствительность: 30/31 = 97%**

**Специфичность: 53/63 = 84%**

#### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Использование положительного и отрицательного позволяет облегчить проверку правильности стабильности набора. Для действительного анализа положительный контроль должен быть более чем 0.3 единицы ОП, и отрицательный контроль должен быть ниже 0.2 единицы. Если значения выходят за эти диапазоны, набор не должен использоваться.

#### ОБНАРУЖЕНИЕ И РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМ

**Проблема:** Отрицательный контроль значительно развил цвет.

**Исправление:** Несоответствующие промывки. Повторить анализ с более тщательными промывками.



#### ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)