



## Набор ИФА для определения антител класса IgG к висцеральному лейшманиозу (*Leishmania*)

Каталог. № : 8100-3  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 25-06-2008

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на английском языке.

### 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. Лобное количество случаев наблюдается 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 анти-лейшманиальные титры антител обычно высоки в течение периода острого заболевания. ELISA - привилегированный лабораторный анализ для серодиагностики ВЛ, хотя непрямые 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-антитело. 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 ферментный конъюгат: | Микролуночки, содержащие антигены <i>Leishmania</i> - 96 лунок в рамке для полосок. 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 тетраметилбензидина (ТМВ).   |
| Промывочный                              | 1 бутылка с 25 мл концентрированного   |

концентрат (20x) 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 кристаллизироваться 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, встряхивания 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. Встряхнуть 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.

#### Информация для заказа:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 а/я 742  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775 612  
 E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)

| 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.

#### Литература:

(См. в оригинале инструкции).