

LEISHMANIA INFANTUM

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Leishmaniose

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9500**

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) viszeraler Leishmaniose. Sero-epidemiologische Überwachung. Serologische Kontrolle von HIV Patienten aus endemischen Gebieten. Post-Therapie Kontrolle von Patienten mit vorliegender HIV-Leishmanie-Koinfektion.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Leishmania infantum* lösliches Promastigoten Antigen beschichtet sind. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	9500-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Leishmania infantum</i> lösliches Promastigoten Antigen	96	Wells
DILB	9500-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	9500-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	9500-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	9500-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	9500-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	9500-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9500-01) entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 9500-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 9500-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 9500-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenseren: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 9500-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 9500-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 9500-10 im Puffer 9500-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 9500-05 gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 9500-02, 9500-03, 9500-04 und 9500-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (Na_3N_3). Lösung 9500-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Hunden gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	9500-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	9500-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9500-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	9500-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	9500-10 + 9500-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Der Testansatz ist gültig, wenn die Absorption (A) der Reagenzienleerwert (serumfreier Blankwert) < 0,350 ist. Nach Abzug des Blankwerts von allen Messergebnissen sollte die Absorption der Positiv-Kontrolle > 1,200 sein und die der Negativ-Kontrolle < 15 % von A der Positiv-Kontrolle.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9500-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Leishmaniose und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn die Absorption der untersuchten Probe niedriger ist als die Absorption des Cut-off Serums 9500-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Leishmania infantum* lösliches Promastigoten-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn die Absorption der untersuchten Probe höher ist als die Absorption des Cut-off Serums 9500-07. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Leishmania infantum* lösliches Promastigoten-Antigen als signifikant angesehen.

Sensitivität und Spezifität:

Die Sensitivität des Tests ist höher als 95% in immunkompetenten Patienten, die unter viszeraler Leishmaniose aufgrund von *L. infantum* leiden. Für HIV-Leishmanie koinfizierte Patienten liegt die Sensitivität des Tests zwischen 60 und 85%. Eine negative Serologie bei positiver Kultur kann vorkommen, wenn die Patienten immunsupprimiert oder mit anderen Leishmania Arten wie *L. major* oder *L. braziliensis* infiziert sind.

Die Spezifität des Tests ist höher als 95% mit Seren von Blutspendern (Schweiz). Eine Kreuzreaktivität kann auftreten durch einige andere parasitische Infektionen wie die afrikanische Trypanosomiasis, Chagas-Krankheit, und Haut- und Schleimhaut Leishmaniose. Interne Studien zeigten, dass hämolytische, lipämische oder ikterische Seren keinen Einfluss auf die Ergebnisse des Tests haben.

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	1.005	1.766	1.381	2.187
Standardabweichung (A Wert)	0.061	0.086	0.097	0.114
Variationskoeffizient (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Referenzen:

Badaro, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C. (1986) Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis : antigen selection for detection of infection specific responses. Am. J. Trop. Med. Hyg. **35**: 72-78.

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.

Senaldi, G., Xiao-su, H., Hoessli, D.C., Bordier, C. (1996) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. Journal of Immunological Methods. **193**: 9-15.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. **116**: 193-199.



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

