

LEISHMANIA INFANTUM

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af visceral leishmaniasis

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9500
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756



Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af visceral leishmaniasis. Sero-epidemiologiske undersøgelser. Serologisk kontrol af HIV-patienter fra endemiske områder. Post terapi kontrol af co-inficerede HIV-Leishmania patienter.

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Leishmania infantum* opløselige promastigote antigener. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	9500-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Leishmania infantum</i> opløselige antigener	96	brønde
DILB	9500-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9500-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9500-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	9500-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Svagt positivt serum	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	9500-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	9500-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 9500-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9500-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 9500-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μ l kontrolsera 9500-06 til -08 i 190 μ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 9500-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 9500-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9500-10 i ufortyndet buffer 9500-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 9500-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 9500-02, 9500-03, 9500-04 og 9500-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (NaN_3). Løsning 9500-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (9500-06 til -08) er fra hund.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	9500-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	9500-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9500-09 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	9500-06 til -8 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortynderbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 15% af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 9500-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af leishmaniasis og sunde, humane sera.

Resultatet er **negativt**, når absorbansen af den analyserede prøve er lavere end absorbansen af det svagt positive serum 9500-07. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod ***Leishmania infantum*** opløselige antigener klinisk ikke-signifikant.

Resultatet er positivt, når absorbansen af den analyserede prøve er højere end absorbansen af det svagt positive serum 9500-07. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod ***Leishmania infantum*** opløselige antigener for at være klinisk signifikant.

Analysens sensitivitet og specificitet:

Sensitiviteten af testen er bedre end 95% i immunkompetente patienter, som lider af visceral leishmaniasis due til *L. infantum*. For HIV-Leishmania co-inficerede patienter er den diagnostiske sensitivitet af testen mellem 60 og 85%. En negativ serologi og en positiv kultur kan forekomme i disse patienter, når de er immunsuppressive eller inficerede med andre Leishmania arter såsom *L. major* eller *L. brazillensis*.

Specificiteten af testen er bedre end 95% med sera fra schweiziske bloddonorer. Krydsrelativitet kan forekomme med andre parasitinfektioner såsom afrikansk trypanosomiasis, Chagas sygdom og cutaneous og mucocutaneous leishmaniasis. Intern evaluering viste, at hemorragisk, lipemia eller icterus sera ikke forstyrrede resultatet af testen.

Hundeserum kan testes med dette kit på samme vilkår.

Repetérbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Repetérbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (absorbans)	1.005	1.766	1.381	2.187
Standardafvigelse (absorbans)	0.061	0.086	0.097	0.114
Variationskoefficient (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Referencer:

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

