

LEISHMANIA INFANTUM

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos av visceral leishmaniasis

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 9500

EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756

Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) visceral leishmaniasis. Seroepidemiologiska undersökningar. Serologisk kontroll av HIV patienter från endemiska områden. Post terapi kontroll av co-infekterade HIV-Leishmania patienter.

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Leishmania infantum* promastigot antigener. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 provningar):

WELL	9500-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Leishmania infantum</i> lösliga antigener	96	brunnar
DILB	9500-02	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	9500-03	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9500-04	Enzym buffert	50	ml
STOP	9500-05	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	9500-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	9500-10	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9500-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 9500-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 9500-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 9500-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 9500-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 9500-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 9500-10 i utspädd buffert. 9500-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 9500-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar 9500-02, 9500-03, 9500-04 och 9500-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 9500-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 9500-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (9500-06 till -08) är av hund ursprung.

Volymer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	9500-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	9500-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	9500-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	9500-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 15 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 9500-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av leishmaniasis och friska humana sera.

Resultatet är **negativ** när absorbansen av det analyserade provet är lägre än absorbansen av det svagt positiva serum 9500-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Leishmania infantum* lösliga antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när absorbansen av det analyserade provet är högre än absorbansen av det svagt positiva serum 9500-07. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Leishmania infantum* lösliga antigen anses vara kliniskt signifikant.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

Känsligheten av testet är bättre än 95 % i immunkompetenta patienter som lider av visceral leishmaniasis du till *L. infantum* för HIV-Leishmania ko-infekterade patienter är känsligheten av testet mellan 60-85 %.

En negative serologi och en positiv kultur kan förekomma I dessa patienter när dem är immunosuppressiva eller infekterade med andra Leishmania arter som *L. major* eller *L. braziliensis*.

Specificiteten av testet är bättre med 95 % med sera från swiss bloddonator. Korsreaktivitet kan förekomma med andra parasitinfektioner som.

Afrikansk trypanosomiasis, Chagas sjukdom och cutaneous och mucocutaneous leishmaniasis. Intern utvärdering visade att hemorragic, lipemic eller ictericsera inte stör resultatet av testet.

Hundserum kan testas med detta kit på samma villkor.

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	1.005	1.766	1.381	2.187
Standardavvikelse (absorbans)	0.061	0.086	0.097	0.114
Variationskoefficient (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Referenser:

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

