

LEISHMANIA INFANTUM

Immuno-enzymatische test voor de diagnose viscerale leishmaniose

96 testen op afscheurbare stripjes bedoeld voor in vitro gebruik

Instructies voor het gebruik van het artikel N° 9500
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01756



Wordt gebruikt voor:

Serologische diagnose (IgG) van viscerale leishmaniose voor epidemiologisch onderzoeken, serologische controle van HIV patiënten van endemische gebieden en post-therapeutische controle van HIV-Leishmania co-geïnfecteerd patiënten.

Principe en presentatie:

De kit bevat het materiaal wat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare stripjes die gesensibiliseerd zijn met het *Leishmania infantum* oplosbare promastigoot antigenen. De aanwezigheid van specifieke anti-lichamen tegenover het parasitaire antigen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - Alkaline fosfatase conjugaat. De gesensibiliseerde strips met de individuele test cupjes maken het mogelijk op een economische wijze kleine hoeveelheden monsters te testen.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

WELL	9500-01	Deelbare ELISA strips gesensibiliseerd met <i>Leishmania infantum</i> oplosbare antigenen	96	putjes
DILB	9500-02	Verdunningsvloeistof (10X geconcentreerd)	50	ml
WASH	9500-03	Wasvloeistof (10X geconcentreerd)	50	ml
ENZB	9500-04	Enzyme buffer	50	ml
STOP	9500-05	Stop oplossing (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negatief controle serum	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Zwak positief controle serum (drempel)	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positief controle serum	200	µl
CONJ	9500-09	Proteïne-A Alkaline fosfatase conjugaat	300	µl
SUBS	9500-10	Fosfatase substraat	20	tabletten
		Reservoir voor de reactieven voor 25 ml multi pipetten	1	stuk
		Kader voor ELISA 8 cupjes houder	1	kader

Bewaar condities:

Bewaar de kit tussen 2 en 8° C (transport op kamer temperatuur). De vervaldatum en het productie nummer staat gedrukt op de doos.

Nodig materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (μl en ml), bakjes, tubes voor de verdunning van de sera. Plakband om de cupjes te bedekken gedurende de incubaties. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op 37°C . ELISA lezer afgesteld op 405 nm.

Vorbereiding van de reactieven:

Gesensibiliseerde strips: Open de zijkant van het aluminium zakje en neem de nodige strips er uit. Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8 cupjes houder. Zo nodig markeer de posities van de ongebruikte cupjes met de gebruikte cupjes. Plaats de houder in de lijst in de goede richting. Conserveer de niet gebruikte strips in de goed gesloten verpakking met het silicagel kussentje.

Verdunningsvloeistof: Verdun de geconcentreerde (10x) verdunningsvloeistof 9500-02, 1:10 in gedestilleerd water.

Wasoplossing: Verdun de geconcentreerde (10x) wasoplossing 9500-03, 1:10 in gedestilleerd water. Zo gewent kunt U ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Buffers die fosfaten bevatten moeten vermeden worden om de enzymatische activiteit van de fosfatase niet te verhinderen.

Negatief controle serum, zwak positief (drempel) en positief serum: Verdun 10 microliters controle serum 9500-06 tot 08 in 190 microliters verdunning vloeistof (eind verdunning 1/20).

De te testen sera: Verdun 10 microliters serum in 2.0 ml verdunning vloeistof (1/20).

Protein A-alkaline fosfatase conjugaat: Verdun het conjugaat 9500-09 in TBS-tween 1:51.

Substraat oplossing: Breng de onverdunde enzyme buffer 9500-04 op kamertemperatuur. Voeg het substraat toe in de ELISA cupjes, los de fosfaat-substraat tabletjes (9500-10) op. Eén tabletje in 2.5ml buffer (9500-04). Goed mengen tot dat de tabletjes goed opgelost zijn.

Stopoplossing: Gebruik reagent 9500-05 onverdund.



Waarschuwing: Soluties 9500-02, 9500-03, 9500-04 en 9500-09 bevat respectievelijk 0.1%, 0.01%, 0.05%, 0.01% et 0.1% sodium azide (N_3Na). Oplossing 9500-02 bevat 0.02% merthiolaat. De stopoplossing 9500-05 (0.5 M K_3PO_4) is irriterend.

De negatieve, zwak positieve en positieve sera (9500-06 tot 08) zijn afkomstig van honden.

Maak de volgende oplossingen:

			Totaal aantal te gebruiken cupjes			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdunning vloeistof (10 x)	9500-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Wasoplossing (10 x)	9500-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugaat	9500-09 +verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Controle sera	9500-06 tot -08 + verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Te testen sera	Serum + verdunningsvloeistof	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substraat	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Methode:

Stap 1: Blokkage:

Vul de cupjes met verdunning vloeistof.

Incubeer 5 tot 15 minuten op kamer temperatuur (Blokkage).

Verwijder de verdunningsvloeistof door afzuigen of uitkloppen van de strips in de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met serum van de monsters:

Vul het eerste cupje van de eerste strip met 100 microliters verdunningsvloeistof (geen serum, blanco).

Vul de volgende 3 cupjes met 100 microliter verdund negatief, zwak positief (drempel) en positief serum.

Vul de andere cupjes met de te testen verdunde sera (100 microliter).

Bedek de cupjes met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder de sera en was 4x met wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Verdeel 100 microliter Protein A-Alkaline fosfatase conjugaat in elk cupje.

Bedek met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4x met de wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Verdeel 100 microliter substraatoplossing per cupje.

Bedek de cupjes met plakband en incubeer gedurende 30 minuten op 37°C.

Stop de reactie door toevoeging van 100 microliter stopoplossing in elk cupje.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog de onderkant van de strips, verwijder luchtbelletjes en meet de absorptie op 405 nm.

Interpretatie van de resultaten:

De gemeten waarden van de blanco (alleen verdunningsvloeistof, geen serum) wordt van alle andere gemeten waarden afgetrokken. De test wordt betrouwbaar geacht als die aan de volgende criteria voldoet: Absorptie (A) van de positieve controle > 1.200, A van de negatieve controle < 15% van A van de positieve controle en A van de blanco tegen over lucht < 0.350.

De titer van het zwak positief serum 9500-07 (drempel) wordt bepaald om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van leishmaniose en normaal menselijk serum optimaal vast te stellen.

Het resultaat is **negatief** wanneer de absorptie van het geanalyseerde monster lager is dan de absorptie van het zwak positief serum 9500-07. In dat geval is de titer van de IgG anti-lichamen tegen *Leishmania infantum* oplosbare antigenen niet klinisch significant.

Het resultaat is **positief** wanneer de absorptie van het geteste monster hoger is dan de absorptie van de zwakke positieve controle 9500-07. In dat geval is de titer van de IgG anti-lichamen tegen *Leishmania infantum* oplosbare antigenen normalerwijze significant.

Sensibiliteit en specificiteit van de test:

Bij immunocompetente patiënten met viscerale Leishmaniose is de gevoeligheid boven de 95%. Bij patiënten co-geïnfecteerd met HIV-Leishmania tussen de 60 en 85%. Een negatieve serologie en een positieve kweek kan worden geobserveerd bij patiënten met immunodepressie of bij infectie met andere types van Leishmania zoals L. major of L. braziliensis.

De specificiteit van de test is boven de 95% bij sera van Zwitserse bloeddonoren.

Kruis-reactie is mogelijk bij sera van patiënten met andere parasitaire infecties zoals Afrikaanse trypanosomiase, de ziekte van Chagas en cutane of mucocutane Leishmaniose.

Een interne studie heeft bewezen dat lipemische, icterische of gehemolyseerde sera geen invloed hebben op de resultaten.

De herhaalbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 menselijke sera in 24 cupjes in één enkel experiment. De reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

	Herhaalbaarheid		Reproduceerbaarheid	
	Monster 1	Monster 2	Monster 1	Monster 2
Gemiddeld (absorptie, A)	1.005	1.766	1.381	2.187
Standaardafwijking (absorptie, A)	0.061	0.086	0.097	0.114
Variatie Coëfficiënt (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Referenties:

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

Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

