

Leishmania infantum IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för diagnos av mänskliga leishmaniasis

96 analyser på enskilda brunnar för in vitro diagnostisk användning och för professionell laboratorieanvändning



Instruktioner för användning av artikel N° 9500
N° reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



Avsedd användning:

Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA kitet är avsedd för kvantitativ upptäckt av IgG antikroppar mot *Leishmania infantum* i humant serum. Sereologi är ett hjälpmedel mot diagnoser och kan användas som ensam metod för diagnos.

Bakgrund:

Leishmaniasis är en vektorburen sjukdom som överförs av sandmyggor. Infektion uppstår genom olika arter av de obligatoriska intracellulära protozoerna i släktet *Leishmania*. Mänsklig infektion orsakas av cirka 21 av 30 arter som är kända för att infektera däggdjur. De vanligaste sjukdomsformerna är kutan leishmaniasis, vilket orsakar hudsjukdomar och visceral leishmaniasis, som vanligtvis påverkar mjälte, lever och benmärg. De huvudsakliga symptomen är feber, förstörd mjälte och kutana känslor. Diagnos av visceral leishmaniasis är baserad på ett positivt resultat genom serologisk testning och positiv PCR på benmärgsaspirat eller hudbiopsier.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunabsorberande analys (ELISA) på ömtåliga mikrotitrering brunnar sensibiliserade med *Leishmania infantum* somatiska promastigote antigener. Specifika antikroppar i testet kommer att binda dessa antigener och tvättning kommer ta bort ospecifika antikroppar. Närvaron av parasit specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Ett andra tvättsteg kommer att avlägsna obundet konjugat. Återgivning av bundna antikroppar görs genom tillsats av pNPP-substrat som blir gult i närvaro av alkaliskt fosfatas. Färgintensiteten är proportionell mot mängden av *Leishmania infantum* specifika antikroppar i provet. Kaliumfosfat tillsättes för att stoppa reaktionen. Absorbans vid 405 nm läses med användning av en ELISA-mikroplatta läsare.

Testet kan utföras med automatiska system, men detta måste valideras av användaren.

Material som ingår i kitet (96 provningar):

WELL	9500-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Leishmania infantum</i> somatiska promastigote antigener	96	brunnar
DILB	9500-02	Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila	50	ml
WASH	9500-03	Tvättlösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	9500-04	Enzymlösning	50	ml
STOP	9500-05	Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positivt kontrollserum (20 x), rött lock	200	µl
CONJ	9500-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock	300	µl
SUBS	9500-10	Fosfatas substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram för ELISA 8-brunnhållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8°C (transportera vid omgivningstemperatur). Undvik långvarig exponering av komponenterna för direkt ljus. Utgångsdatumet och partinumret av kitet anges på sidan av lådan. Efter första öppningen är alla reagens stabila till och med utgångsdatumet när de lagras vid 2-8°C.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för spädning av sera. Limtejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37°C. ELISA läsare inställd på 405 Nm. Manuell eller automatisk utrustning för sköljning av brunnar. Vortex-blandare. Timer.

Preparationer av reagens innan användning:

Få alla reagens till rumstemperatur och blanda före användning.

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 9500-01 och ta bort antal brunnar som behövs (en för blank, tre för kontroller, plus antal prov). 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.

Spädningsbuffert: utspädd spädningsbuffert (10 x) koncentrat 9500-02, 1/10 i destillerat vatten. Detta används för utspädning av kontroller, prover och konjugat. Den utspädda bufferten är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Tvättlösning: utspädd tvättlösning (10 x) koncentrat 9500-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvättlösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas. Den utspädda tvättlösningen är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Kontrollsera: utspädd 10 µl kontrollsera 9500-06 till -08 i 190 µl spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/20). Det utspädda kontrollsera är stabilt i 2 månader vid 2-8°C.

Konjugat: utspädd konjugat 9500-09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: 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/erna. Späd substratet på analysdagen och skydda röret från direkt ljus. Tabletter och substratlösningar borde vara färglösa, eller bara ha en ljusgul skiftning. Om en tablett eller en substratlösning blir gul kan den ha delvis hydrolyserats och bör kasseras. Förvara inte substratlösningen.

Stopplösning: använd reagens 9500-05 utspädd.

Provtagning och förberedning

Använd humant-serum. Serum bör förvaras vid 2-8°C om det analyseras inom några dagar, annars lagras vid -20°C eller lägre. Undvik upprepade frysning och upptining.

Vortexprover och späd 1/201 i spädningsbuffertlösning (t.ex. 5 µl prov i 1,0 ml).

Varningar och säkerhetsåtgärder:

Giftiga föreningar finns i följande koncentration:

Komponent	Referens	Natriumazid (N _a N ₃)	Mertiolat
Spädningsbuffert (10 x)	9500-02	0,1%	0,02%
Tvättlösning (10 x)	9500-03	0,05%	/
Enzybuffert	9500-04	0,01%	/
Kontrollsera (20 x)	9500-06 till -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9500-09	0,1%	/

Vid de använda koncentrationerna har natriumazid och merthiolat ingen toxikologisk risk vid kontakt med hud och slemhinnor.

- Stopplösningen 9500-05 (0.5 M K₃PO₄) är irriterande.
- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (9500-06 till -08) är från hundar.
- Behandla alla reagens och prov som potentiellt infektiöst material.
- Byt inte reagenser av olika partier eller Bordier ELISA-kit.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagens i denna utrustning.
- Använd inte reagens efter dess utgångsdatum.
- Stäng reagensflaskorna tätt omedelbart efter användning, och byt inte ut skruvlock för att undvika förorening.
- Använd separata och rena pipetter-tips för varje prov.
- Återanvänd inte mikrobrunnar.
- Undvik försämring av mikrobrunnarna genom mekanisk verkan (spetsar/koner, munstycken).
- Beskrivningarna av symboler som används på etiketterna finns på webbplatsen www.bordier.ch.

Avfallshantering:

Alla material som används för detta test anses allmänt som farligt avfall. Se nationella och regionala lagar och förordningar för bortskaffande av farligt avfall.

Procedur:

Vid körning av analysen, undvik bildandet av bubblor i brunnarna.

Steg 1: Blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningbuffertlösning.

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

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

Steg 2: Inkubation med prover:

Fyll den första brunnen i remsan med 100 µl spädningbuffert (inget serumblankt).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med respektive 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontrollsera. För analyser av mer än 25 prover rekommenderar vi att fylla de tre sista brunnarna med kontrollsera som ett duplikat.

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

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

Ta bort sera och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 3: Inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn (inklusive det inget serumblankt).

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

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 4: Inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

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

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

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Om det behövs, torka botten av brunnarna och eliminera bubblor. Mät absorbanserna vid 405 Nm inom 1 timme efter tillsatsen av stopplösning.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serumblankt från alla mätvärden. Beräkna de genomsnittliga absorbansvärdena för duplicerade serumkontroller när det är tillämpligt. Testet är giltigt om dem påföljande kriterierna uppfylls:

- absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200
- A av svagt positiv kontroll > 10% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 8% av A av positiv kontroll
- A av inget serumblankt < 0,350

Kvalitetskontroll av nuvarande partier publiceras på vår hemsida: www.bordier.ch.

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

Det skilda index av ett prov definieras efter subtraktion av det inget serumblankt ämne som:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbans prov}}{\text{Absorbans avskilt serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Leishmania infantum* antigener är kliniskt icke signifikant.

Resultatet är **positivt** när indexet av det analyserade provet är högre än **1,0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot *Leishmania infantum* antigener är kliniskt icke signifikant. Det indikerar att patienten har haft kontakt med parasiten.

En gråzon kan definieras av varje laboratorium enligt patientpopulationen. Vid gränsöverskridande eller tveklaktiga resultat rekommenderar vi att du upprepar testet igen 2-4 veckor senare med ett nytt prov.

Vid positivt eller tveksamt resultat rekommenderar vi att du utför ett bekräftelsetest (oftast med western blot) om ett sådant test är tillgängligt eller krävs enligt nationella bestämmelser.

Analytiska prestationer:

Analytisk specificitet:

En specificitet på 100% fann man i 15 sera från patienter med andra parasitinfektioner. Korsreaktivitet uppträder huvudsakligen med parasitinfektioner såsom afrikansk trypanosomiasis, Chagas sjukdom och kutan och mukokutan leishmaniasis.

Ingen positiv eller negativ interferens sågs när sera tillsatts suprafysiologiska koncentrationer av hemoglobin, lipider eller bilirubin.

Noggrannhet:

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

Följande prestationer kan inte utvärderas eftersom det inte finns något certifierat referensmaterial för denna analys:

- Analytisk känslighet (gränser för detektion och kvantifiering)
- Noggrannhet
- Sannhet
- Mätområde
- Linjäritet

Kliniska prestationer:

Diagnostisk känslighet:

En sensitivitet på 93% fann man i 29 sera från immunkompetenta patienter (HIV-) med visceral leishmaniasis på grund av *L. infantum*. En sensitivitet på 67% fann man i 21 sera från patienter dubbelinfekterade med HIV och *Leishmania*. En negativ serologi och en positiv odling kan förekomma hos dessa patienter när de är immunsupprimerade eller infekterade med andra *Leishmania*-arter såsom *L. major* och *L. braziliensis*.

Diagnostisk specificitet:

En specificitet på 100% fann man i 99 sera från schweiziska blodgivare.

Positivt och negativt prediktivt värde:

Ett PPV på 100% och ett NPV på 98% fann man i den ovannämnda HIV- populationen och 100% och 93% med den ovannämnda HIV+ populationen.

Förväntade värden i normala och drabbade populationer:

I en normalpopulation bestående av 99 schweiziska blodgivare är det förväntade indexvärdet 0,39. I en infekterad population med 13 sera från patienter med visceral leishmaniasis är det förväntade indexvärdet 2,64.

Incidenter:

Varje allvarlig incident som inträffar i samband med produkten ska anmälas till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.

Begränsningar:

Diagnos av en infektionssjukdom bör inte upprättas på grundval av ett enda testresultat. En noggrann diagnos bör ta hänsyn till endemisk situation, klinisk historia, symptomatologi, bildbehandling och serologiska data. Hos immunförsvagade patienter och nyfödda är serologiska data av begränsat värde.

Referenser:

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.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. **116**: 193-19

Lévêque, M.F., Battery, E., Delaunay, P., Lmimouni, B.E., Aoun, K., L'Ollivier, C., et al. (2020) Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis **14** : e0008139.



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

