

Leishmania infantum IgG ELISA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner viszeraler Leishmaniose

96 Tests in einzelnen Wells für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz



Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **9500**
EC reg. N°: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



Anwendungsgebiet:

Der Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA-Kit ist zum quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Leishmania infantum* in humanem Serum bestimmt. Serologie ist eine Diagnosehilfe und kann nicht als alleinstehende Methode zur Diagnosestellung verwendet werden.

Hintergrund-Informationen:

Leishmaniose ist eine vektorübertragene Erkrankung, dessen Hauptüberträger die Sandfliege ist. Die Infektion wird durch verschiedene Spezies des obligat intrazellulären Protozoen der Gattung *Leishmania* übertragen. Humane Infektionen werden von etwa 21 der 30 Spezies, die Infektionen bei Säugetieren auslösen, verursacht. Zu den bekanntesten Erkrankungsformen zählen die kutane Leishmaniose, bei der die Haut betroffen ist, und die viscerale Leishmaniose, von der meistens die Milz, die Leber und das Knochenmark betroffen sind. Meistens wird die Erkrankung von Fieber, vergrößerter Milz und Hautsymptomatik begleitet. Viscerale Leishmaniose wird anhand von positiven serologischen Testergebnissen, positivem PCR und Knochenmark- bzw. Hautbiopsien diagnostiziert.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das komplette benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er brechbaren Mikrotiterplatte, deren Wells mit *Leishmania infantum* löslichem Promastigoten-Antigen beschichtet sind. Spezifische Antikörper werden sich an das Antigen anheften, wobei unspezifische Bestandteile durch Abwaschen entfernt werden können. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Beim wiederholten Abwaschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt mit pNPP-Substrat, der bei Kontakt mit alkalischer Phosphatase gelb wird. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge von spezifischen *Leishmania infantum*-Antikörpern in der Probe. Die Reaktion wird mit Dikaliumhydrogenphosphat unterbrochen. Zum Auslesen der Absorbanz bei 405 nm wird ein ELISA-Microplattenleser verwendet.

Eine Automatisierung des Tests ist möglich, muss aber vom Anwender validiert werden.

Kitbestandteile (96 Tests):

| | | | | |
|--------------------|---------|--|-----|-----------|
| WELL | 9500-01 | Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Leishmania infantum</i> löslichem Promastigoten Antigen | 96 | wells |
| DILB | 9500-02 | Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat, violette Färbung | 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 (20 x), grüne Verschlusskappe | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 9500-07 | Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum (20 x), gelbe Verschlusskappe | 200 | µl |
| CONTROL + | 9500-08 | Positives Kontroll-Serum (20 x), rote Verschlusskappe | 200 | µl |
| CONJ | 9500-09 | Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat (50 x), violette Verschlusskappe | 300 | µl |
| SUBS | 9500-10 | Phosphatase Substrat (para-Nitrophenylphosphat) | 20 | Tabletten |
| | | Multipipetten-Reservoir 25 ml | 1 | Stück |
| | | Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen) | 1 | Stück |

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung des Kits bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Die Komponenten sollten direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt werden. Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Das Verfallsdatum nach dem Öffnen der Reagenzien ist bei einer Lagertemperatur von 2-8°C gültig.

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. Manuelle oder automatische Ausrüstung zum Spülen der Wells. Vortexmischer. Stoppuhr.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Alle Reagenzien vor der Anwendung auf Raumtemperatur bringen und gut vermischen.

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (9500-01) entnehmen (einen Teststreifen für die Blindprobe und drei Teststreifen für die Kontrollen plus die Anzahl der Proben). 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. Dies wird für die Verdünnung von Kontroll-Serum, Proben und Konjugaten verwendet. Der Verdünnungspuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

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. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Kontroll-Serum: Je 10µl der Kontrollseren 9500-06 bis -08 mit 190 µl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt). Das verdünnte Kontrollserum ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Konjugat: Das Konzentrat 9500-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:50 verdünnt. Die Verdünnung des Konjugats muss am Tag der Probeentnahme stattfinden. Verdünntes Konjugat nicht lagern.

Substrat-Lösung: Die Substrattabletten 9500-10 in unverdünntem Enzympuffer 9500-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen. Substrat am Tag der Probeentnahme verdünnen und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Tabletten und Substratlösungen sollten eine leicht gelbliche oder keine Färbung aufweisen. Tabletten und Substrate mit einer gelben Färbung sollten aufgrund möglicher Hydrolyisierung entsorgt werden. Substratlösung nicht lagern.

Stopp-Lösung: Reagenz 9500-05 gebrauchsfertig.

Probenvorbereitung und -Lagerung:

Humanes Serum verwenden. Serum, das innerhalb von wenigen Tagen untersucht werden soll, sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Anderenfalls sollte es bei -20°C oder tiefer eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Probenmaterial mischen und 1:201 in Verdünnungspuffer Lösung auflösen (z.B. 5 µl Probe in 1,0 ml).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

Die Mengen der giftigen Substanzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

| Komponente | Referenz | Natriumazid (NaN ₃) | Thiomersal |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|------------|
| Verdünnungspuffer (10 x) | 9500-02 | 0,1% | 0,02% |
| Waschpuffer (10 x) | 9500-03 | 0,05% | / |
| Enzympuffer | 9500-04 | 0,01% | / |
| Kontrollserum (20 x) | 9500-06 zu -08 | 0,1% | 0,02% |
| Konjugat (50 x) | 9500-09 | 0,1% | / |

Natriumazid und Thiomersal in den angegebenen Konzentrationen sind bei Haut- oder Schleimhautkontakt nicht giftig.

- Die Stopp-Lösung 9500-05 (0,5 M K₃PO₄) ist reizend.
- Die Kontrollseren (9500-06 bis -08) wurden aus Hunden gewonnen.
- Alle Reagenzien und Proben sollten als potenziell ansteckendes Material behandelt werden.
- Reagenzien zwischen einzelnen Einheiten und Bordier ELISA-Kits nicht austauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht zusammen mit den Reagenzien aus diesem Kit verwenden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht verwenden.
- Reagenzflaschen unmittelbar nach Gebrauch dicht verschliessen. Flaschendeckel dürfen nicht vertauscht werden, um gegenseitige Kontamination zu vermeiden.
- Separate und saubere Pipettenspitzen für jede Patientenprobe verwenden.
- Mikrowells nur einmal verwenden.
- Vermeiden Sie eine Beschädigung der Mikrovertiefungen durch mechanische Einwirkungen (Kegel, Düsen).
- Die Beschreibungen der auf den Etiketten verwendeten Symbole finden Sie auf der Website www.bordier.ch.

Entsorgung:

Die in diesem Test verwendeten Materialien gelten als gefährliche Abfälle. Entsorgung gefährlicher Abfälle muss entsprechend den nationalen und regionalen Rechtsvorschriften stattfinden.

Durchführung:

Blasenbildung während des Nachweisverfahrens vermeiden.

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 (serumfreier Blank).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren. Für Nachweisverfahren mit mehr als 25 Proben wird eine Duplikaterstellung mit den drei verbleibenden Wells empfohlen.

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 ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren (einschliesslich serumfreier Blankwert).

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

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 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, falls notwendig, abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe der Stopp-Lösung messen.

Ergebnis-Auswertung:

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1,200
- A der schwach positiven Kontrolle > 10% der A der positiven Kontrolle
- A der negativen Kontrolle < 8% der A der positiven Kontrolle
- A des serumfreien Blanks < 0,350

Qualitätskontrollen aktueller Testeinheiten sind auf unserer Internetseite zu finden: www.bordier.ch.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 9500-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit viszeraler Leishmaniose und von gesunden Patienten unterschieden werden kann. Die Cutoff-Index einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Leishmania infantum*-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das *Leishmania infantum*-Antigen als signifikant angesehen. Es zeigt, dass der Patient Kontakt mit dem Parasiten hatte.

Die Unsicherheitsbereich sollte von jedem Labor ausgehend von der Patientenpopulation einzeln definiert werden. Bei Ergebnissen im Unsicherheitsbereich wird eine Wiederholung des Tests mit einer neuen Probe nach 2 bis 4 Wochen empfohlen.

Bei positiven oder unklaren Ergebnissen empfehlen wir die Durchführung eines Bestätigungstests (meist durch Western Blot), sofern ein solcher Test verfügbar oder aufgrund nationaler Vorschriften erforderlich ist.

Analytische Leistungen:

Analytische Spezifität:

Eine Spezifität von 100% wurde bei einer Gruppe von 15 Seren von Patienten mit anderen Parasiteninfektionen ermittelt. Kreuzreaktivität kann bei bestimmten anderen Parasiteninfektionen wie der afrikanischen Trypanosomiasis, der Chagas-Krankheit und der kutanen und mukokutanen Leishmaniose auftreten.

Es wurden keine positiven oder negativen Interferenzen mit supraphysiologischen Konzentrationen von Hämoglobin, Lipiden oder Bilirubin in Seren beobachtet, die mit Interferenzen ergänzt wurden.

Erläuterung:

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 |

Die folgenden Leistungen können nicht bewertet werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial für diese Analyse vorliegt:

- Analytische Empfindlichkeit (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen)
- Genauigkeit
- Richtigkeit
- Messbereich
- Linearität

Klinische Leistungen:

Diagnostische Sensitivität:

Eine Sensitivität von 93% wurde bei einer Gruppe von 29 Seren von immunkompetenten (HIV-) Patienten mit viszeraler Leishmaniose aufgrund von *L. infantum* ermittelt. Eine Sensitivität von 67% wurde bei einer Gruppe von 21 Seren von HIV-*Leishmania*-koinfizierten Patienten ermittelt. Diese Patienten können eine negative Serologie und eine positive Kultur aufweisen, wenn sie immun-supprimiert oder mit anderen *Leishmania*-Arten infiziert sind, z. B. *L. major* oder *L. braziliensis*.

Diagnostische Spezifität:

Eine Spezifität von 100% wurde bei einer Gruppe von 99 Seren von (Schweizer) Blutspendern ermittelt.

Positiver (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV):

Für die obengenannten HIV-negative Population wurde ein PPV von 100% und ein NPV von 98%, für die obengenannte HIV-positive Population ein PPV von 100% und ein NPV von 93% ermittelt.

Erwartete Werte in normalen und betroffenen Populationen:

In einer Normalpopulation von 99 Schweizer Blutspendern beträgt der erwartete Indexwert 0,39. In einer betroffenen Population mit 13 Seren von Patienten mit Leishmaniose beträgt der erwartete Indexwert 2,64.

Zwischenfälle:

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

Grenzen:

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand von Ergebnissen eines einzelnen Tests erfolgen. Die vollständige Diagnosestellung sollte unter Berücksichtigung der endemischen Situation, Krankengeschichte und Symptomatik sowie unter Verwendung von bildgebenden Verfahren sowie serologischen Daten stattfinden.

Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten haben die serologischen Daten eine beschränkte Aussagekraft.

Referenzen:

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Lepout, 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 Trop. 116: 193-9

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

