

# Leishmania infantum IgG ELISA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human leishmaniasis

96 analyser på særskilte brønde til in vitro diagnostisk brug og til professionel laboratoriebrug



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 9500  
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



## Tilsigtet anvendelse:

Bordier *Leishmania infantum* IgG ELISA kit er beregnet til kvantitativ påvisning af IgG antistoffer mod *Leishmania infantum* i humant serum. Serologi er en hjælp til diagnose og kan ikke bruges som eneste diagnosemetode.

## Baggrund:

Leishmaniasis er en vektorbåret sygdom transmitteret af sandfluer. Infektion forekommer af forskellige arter af de obligatoriske intracellulære protozoer af slægten *Leishmania*. Human infektion er forårsaget af omkring 21 ud af 30 arter, der vides at inficere pattedyr. De mest almindelige sygdomsformer er kutan leishmaniasis, som forårsager hudlidelser og visceral leishmaniasis, som normalt rammer milt, lever og knoglemarv. De vigtigste symptomer er feber, forstørret milt og kutane følelser. Diagnose af visceral leishmaniasis er baseret på et positivt resultat ved serologisk testning og positiv PCR på knoglemarvsaspirater eller hudbiopsier.

## Princip og præsentation

Kittet giver alt det materiale som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA), på skrøbelige mikrotitreringsbrønde sensibiliserede med *Leishmania infantum* opløselige promastigote antigener. Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af parasit-specifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Afsløring af bundne antistoffer vil ske ved tilsætning af pNPP substrat, som bliver gul i nærvær af alkalisk phosphatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Leishmania infantum*-specifikke antistoffer i prøven. Kaliumphosphat tilsættes for at stoppe reaktionen. Absorbans ved 405 nm læses ved anvendelse af en ELISA mikroplade læser.

Prøven kan udføres med automatiske systemer, men dette skal valideres af brugeren.

## Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

<b>WELL</b>	9500-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Leishmania infantum</i> opløselige promastigote antigener	96	brønde
<b>DILB</b>	9500-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat farvet lilla	50	ml
<b>WASH</b>	9500-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
<b>ENZB</b>	9500-04	Enzym buffer	50	ml
<b>STOP</b>	9500-05	Stopløsning (0.5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9500-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9500-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9500-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
<b>CONJ</b>	9500-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl
<b>SUBS</b>	9500-10	Fosfatase-substrat (Para-nitrophenylphosphat)	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), undgå langsigtet eksponering af komponenterne i direkte lys. Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen. Efter første åbning er alle reagenser stabile indtil udløbsdatoen, dette er om de opbevares ved 2-8°C.

## Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and µl). 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. Manuel eller automatisk udstyr til skylning af brønde. Vortex mixer. Timer.

### Klargøring af reagens inden anvendelse:

Hold alle reagenser i stuetemperatur og bland dem inden brug.

**Elisa brønde:** åbn siden af aluminiumstasken 9500-01, og tag det nødvendige antal brønde. (en for blankt, tre for kontroller plus antal prøver). 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 tørrepudd.

**Fortyndingsbuffer:** fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 9500-02, 1/10 i destilleret vand. Dette anvendes til fortynding af kontroller, prøver og konjugater. Den fortyndede buffer er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

**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. Den fortyndede vaskeopløsning er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

**Kontrolsera:** fortynd 10 µl kontrolsera 9500-06 til -08 i 190 µl fortyndingsbufferopløsning (endelig fortynding 1/20). Den fortyndede kontrolsera er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

**Konjugat:** fortyndet konjugat 9500-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

**Substratløsning:** opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 9500-10 i ufortyndet enzym buffer 9500-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst. Fortynd substratet på analysedagen og beskyt røret fra direkte lys. Tabletter og substratopløsninger bør være farveløse eller bør kun have en lille gul tinge. Hvis en tablet eller en substratopløsning bliver gul, kan den have været delvis hydrolyseret og bør kasseres. Opbevar ikke substratopløsningen.

**Stopløsning:** anvend reagens 9500-05 ufortyndet.

### Prøveudtagning og forberedelse:

Brug humant serum. Hvis analyseres inden for få dage skal serum skal opbevares ved 2-8°C, ellers opbevares ved -20°C eller lavere. Undgå at gentage frysning og optøning. Vortex prøver og fortynd 1/201 i fortyndingsbufferopløsning (fx 5 µl prøve i 1,0 ml).

### Advarsler og sikkerhedshensyn:

Giftige stoffer findes i følgende koncentration:

Komponent	Reference	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merthiolat
Fortyndingsbuffer (10 x)	9500-02	0,1%	0,02%
Vaskeopløsning (10 x)	9500-03	0,05%	/
Enzymbuffer	9500-04	0,01%	/
Kontrolsera (20 x)	9500-06 til -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	9500-09	0,1%	/

Ved de anvendte koncentrationer har natriumazid og merthiolat ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinder.

- Stopløsning 9500-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (9500-06 til -08) er fra hund.
- Behandle alle reagenser og prøver som potentielt infektiøst materiale.
- Byt ikke reagenser fra forskellige partier eller Bordier ELISA kits.
- Brug ikke reagenser fra andre producenter med reagenser i dette kit.
- Brug ikke reagenser efter deres udløbsdatoe.
- Luk reagensflasker tæt straks efter brug, og udskift ikke skruehætter for at undgå forurening.
- Brug separate og rene pipetter tips til hver prøve.
- Mikrobrønde må ikke genbruges.
- Undgå forringelse af mikrobrønde ved mekanisk påvirkning (spidser/kegler, dyser).
- Beskrivelser af de anvendte symboler på etiketterne kan findes på hjemmesiden [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

### Vedrørende Bortskaffelse:

Alle materialer, der bliver anvendt i denne test, betragtes generelt som farligt affald. Henvi til nationale og regionale love og bestemmelser for bortskaffelse af farligt affald.

## Procedure:

Når du kører analysen, undgå at der dannes bobler i brøndene.

### Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

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

### Trin 2: Inkubation med prøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (ikke-serumblank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med henholdsvis 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrol serum. Til analyser med mere end 25 prøver anbefaler vi at fylde de tre sidste brønde med kontrol sera som et duplikat.

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera prøver (100 µl hver).

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

Fjern sera, og vask 4 x ~ 250 µl med vaskeløsning.

### Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet konjugat i hver brønd. (inklusive ikke-serumblank).

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

Fjern konjugat, og vask 4 x med ~ 250 µl 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:

Hvis det er nødvendigt, tør bunden af brøndene af, og fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm. inden for 1 time efter tilsætning af stopopløsning.

## Fortolkning:

Træk værdien af ikke-serumblank fra alle målte værdier. Når det er relevant, beregnes de gennemsnitlige absorbansværdier for duplikeret serumkontrol. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt:

- Absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200
- A med svag positiv kontrol > 10% af A med positiv kontrol
- A af negativ kontrol < 8% af A af positiv kontrol
- A af ikke-serumblank < 0,350

Kvalitetskontrol af aktuelle partier offentliggøres på vores hjemmeside: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

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

Afsnitets afskårne indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serumblank som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{absorbans prøve}}{\text{Absorbans afskåret serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når Indeks af den analyserede prøve er lavere end **1,0**. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod *Leishmania infantum* antigener klinisk ikke signifikant.

Resultatet er **positivt**, når Indeks af den analyserede prøve er højere end **1,0**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod *Leishmania infantum* antigener at være klinisk signifikant. Det indikerer, at patienten har haft kontakt med parasitten.

En grå zone kan defineres af hvert laboratorium i overensstemmelse med dets patientpopulation. I tilfælde af grænseoverskridende eller tvivlsomme resultater anbefaler vi at gentage testen igen 2-4 uger senere med en frisk prøve.

I tilfælde af et positivt eller tvivlsomt resultat, anbefaler vi at udføre en bekræftelsestest (oftest med western blotting), hvis en sådan test er tilgængelig eller kræves i henhold til nationale bestemmelser.

## Analytisk ydeevne:

### Analytisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 100 % hos 15 sera fra patienter med andre parasitære infektioner. Krydsreaktivitet kan forekomme i nogle andre parasitære infektioner såsom afrikansk trypanosomiasis, Chagas-sygdom, og kutan og mukokutan leishmaniose.

Der blev ikke observeret nogen positiv eller negativ interferens med suprafysiologiske koncentrationer af hæmoglobin, lipider eller bilirubin i sera suppleret med interferenter.

### Præcision:

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
<b>Gennemsnit (absorbans)</b>	1,005	1,766	1,381	2,187
<b>Standardafvigelse (absorbans)</b>	0,061	0,086	0,097	0,114
<b>Variationskoefficient (%)</b>	6,1	4,9	7,1	5,2

Følgende præstationer kan ikke evalueres, fordi der ikke er noget certificeret referencemateriale til denne analyse:

- Analytisk følsomhed (detektions- og kvantificeringsgrænser)
- Nøjagtighed
- Rigtighed
- Måleområde
- Linearitet

## Kliniske præstationer:

### Diagnostisk følsomhed:

Der blev fundet en følsomhed på 93 % hos 29 sera fra immunkompetente patienter (HIV-), der led af visceral leishmaniose du to *L. infantum*. Der blev fundet en følsomhed på 67 % hos 21 sera HIV-*Leishmania*-medinficerede patienter. En negativ serologi og en positiv kultur kan forekomme hos disse patienter, når de er immunsupprimerede eller inficeret med andre *Leishmania*-arter såsom *L. major* eller *L. braziliensis*.

### Diagnostisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 100 % med 99 sera fra bloddonorer (schweiziske).

### Positiv og negativ prædiktiv værdi:

Der blev fundet en PPV på 100 % og en NPV på 98 % hos ovennævnte HIV- population og 100 % og 93 % hos ovennævnte HIV+population.

### Forventede værdier i normale og berørte populationer:

I en normal population af 99 schweiziske bloddonorer er den forventede indekssværdi 0,39. I en påvirket population på 13 sera fra patienter, der lider af visceral leishmaniose, er den forventede indekssværdi 2,64.

## Hændelser:

Enhver alvorlig hændelse, der indtræffer i forbindelse med udstyret, skal meddeles fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

## Begrænsninger:

Diagnose af en smitsom sygdom bør ikke udarbejdes på basis af et enkelt testresultat. En præcis diagnose bør tage hensyn til endemisk situation, klinisk historie, symptomatologi, billeddannelse samt serologiske data.

Hos immunkompromitterede patienter og nyfødte er serologiske data af begrænset værdi.

## Referencer:

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 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

