

Leishmania infantum IgG ELISA

Immuno-enzymatische test voor de diagnose van leishmania bij mensen

96 testen op deelbare strips bedoeld voor in-vitro diagnostisch en professioneel laboratoriumgebruik



Instructies voor het gebruik van het artikel N° 9500
N.° reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



Wordt gebruikt voor:

De kit *Leishmania infantum* IgG ELISA van Bordier is bedoeld voor kwantitatieve detectie van IgG-antilichamen tegen *Leishmania infantum* in humaan serum. Serologie is een hulpmiddel bij diagnose en kan niet gebruikt worden als enige manier van diagnostisering.

Achtergrond:

Leishmania is een vectorziekte die wordt overgedragen door zandvliegen. Infectie geschiedt via diverse soorten van de verplichte intracellulaire protozoa van hete *Leishmania*-genus. Humane infectie wordt veroorzaakt door ongeveer 21 van de 30 soorten waarvan bekend is dat zij verantwoordelijk zijn voor zoogdierbesmetting. De meest gebruikelijke ziektevormen zijn cutane leishmaniasis, dat huidafwijkingen veroorzaakt, en viscerale leishmaniasis, dat doorgaans milt, lever en beenmerg aantast. De belangrijkste symptomen zijn koorts, vergrote milt en huidaandoeningen. Het diagnosticeren van viscerale leishmaniasis berust op een positieve serologische uitslag en positieve PCR van beenmergaspiraat of huidbiopsies.

Principe en presentatie:

De kit bevat al het materiaal dat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare microtitratiestripjes die gesensibiliseerd zijn met oplosbare promastigote *Leishmania infantum*-antigenen. Specifieke antilichamen in het monster binden zich aan deze antigenen en door wassen worden onspecifieke antilichamen verwijderd. De aanwezigheid van parasiet-specifieke antilichamen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat. Middels een tweede wasbeurt wordt ongebonden conjugaat verwijderd. Om gebonden antilichamen te detecteren wordt pNPP-substraat toegevoegd, dat bij aanwezigheid van alkalinefosfatase geel kleurt. Kleurintensiteit is in proportie met de hoeveelheid *Leishmania infantum*-specifieke antilichamen in het monster. Na toevoegen van kaliumfosfaat stopt de reactie. Absorptie bij 405 nm wordt gelezen met gebruik van een ELISA-microplaatlezer.

De test kan uitgevoerd worden met geautomatiseerde systemen, maar dit moet gevalideerd worden door de gebruiker.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

WELL	9500-01	Deelbare ELISA strips, gesensibiliseerd met oplosbare promastigote <i>Leishmania infantum</i> -antigenen	96	wells
DILB	9500-02	Verdunningsbuffer (10 x geconcentreerd), paars van kleur	50	ml
WASH	9500-03	Wasvloeistof (10 x geconcentreerd)	50	ml
ENZB	9500-04	Enzybuffer	50	ml
STOP	9500-05	Stopoplossing (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Negatief controleserum (20x), groene dop	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Zwak-positief controleserum (drempel, 20 x), gele dop	200	µl
CONTROL +	9500-08	Positief controleserum (20 x), rode dop	200	µl
CONJ	9500-09	Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat (50 x), paarse dop	300	µl
SUBS	9500-10	Fosfatesubstraat (para-nitrofenylfosfaat)	20	tabletten
		Multipipet reservoir, 25 ml	1	stuks
		Kader voor ELISA 8-wellshouder	1	stuks

Bewaar condities:

Bewaar de kit bij 2-8°C (transport bij kamertemperatuur), vermijd langdurige blootstelling van de bestanddelen aan direct licht. Vervaldatum en productienummer van de kit staan vermeld op de zijkant van de doos. Na openen zijn alle reagens tot aan de vervaldatum stabiel, mits bewaard bij 2-8°C.

Benodigd materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (ml en µl). Bakjes. Verdunningstubes voor sera. Plakband voor afdekken van de stripjes tijdens incubatie. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op 37°C. ELISA lezer afgesteld op 405 nm. Handmatige of geautomatiseerde apparatuur voor het afspoelen van de wells. Vortexmixer. Timer.

Vorbereiding van de reagens:

Laat alle reagens op kamertemperatuur komen en vermeng voor gebruik.

ELISA strips: open de zijkant van aluminiumzak 9500-01 en neem het aantal benodigde strips eruit (eentje voor serumvrije blanco, drie voor controles, plus het aantal monsters). Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8-wells-houder(s). Vul de lege plekken van de houder zo nodig met gebruikte wells. Plaats de houder(s) in de juiste richting in de lijst. Hersluit de geopende verpakking met silicagel kussentje.

Verdunningsbuffer: verdun de geconcentreerde verdunningsvloeistof (10 x) 9500-02, 1:10 met gedestilleerd water. Dit wordt gebruikt voor verdunning van controles, monsters en conjugaat. De verdunningsvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Wasoplossing: verdun de geconcentreerde wasoplossing (10 x) 9500-03, 1:10 met gedestilleerd water. U kunt ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Vermijd het gebruik van fosfaat-houdende buffers, aangezien dit de enzymatische activiteit van alkalische fosfatase kan verhinderen. De verdunde wasvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Controlesera: verdun 10 µl controlesera 9500-06 tot -08 in 190 µl verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:20). Het verdunde controleserum is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Conjugaat: verdun conjugaat 9500-09 met verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:50). Verdun conjugaat op de testdag zelf. Het verdunde conjugaat niet bewaren.

Substraatoplossing: los de tablet(ten) fosfatasesubstraat 9500-10 op in de onverdunde enzymbuffer 9500-04 (1 tablet in 2,5 ml buffer). Vortex tot de tablet(ten) volledig is/zijn opgelost. Verdun het substraat op de testdag zelf en bescherm het buisje tegen direct licht. Tabletten en substraatoplossingen dienen kleurloos of hooguit lichtgeel van kleur te zijn. Kleurt een tablet of substraatoplossing geel, dan kan het deels gehydrolyseerd zijn en dient weggegooid te worden. De substraatoplossing niet bewaren.

Stopoplossing: gebruik reagens 9500-05 onverdund.

Monstercollectie en voorbereiding:

Gebruik humaan serum. Als het serum binnen enkele dagen geanalyseerd wordt dient het bewaard te worden bij 2-8°C, zo niet, dan bewaren bij -20°C of lager. Vermijd herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Vortex de monsters en verdun tot 1:201 in verdunningsbuffer (bijv. 5 µl monster in 1,0 ml).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen:

Toxische bestanddelen in de volgende concentraties:

Bestanddeel	Referentie	Natriumazide (N _a N ₃)	Thiomersal
Verdunningsbuffer (10 x)	9500-02	0,1%	0,02%
Wasoplossing (10 x)	9500-03	0,05%	/
Enzymbuffer	9500-04	0,01%	/
Controlesera (20 x)	9500-06 tot -08	0,1%	0,02%
Conjugaat (50 x)	9500-09	0,1%	/

In de gebruikte concentraties zijn er voor natriumazide en thiomersal geen toxicologische risico's als gevolg van aanraking met huid of slijmvliezen.

- Stopoplossing 9500-05 (0,5 M K₃PO₄) kan irritatie geven.
- De negatieve, zwak-positieve en positieve controlesera (9500-06 tot -08) zijn afkomstig van honden.
- Behandel alle reagens en monsters als potentieel geïnfecteerd materiaal.
- Gebruik niet de reagens van andere partijen of andere Bordier ELISA-kits.
- Gebruik geen reagens van andere fabrikanten met reagens voor deze kit.
- Gebruik geen reagens waarvan de vervaldatum is verlopen.
- Sluit de ampullen reagens direct na gebruik stevig af. Gebruik voor elk ampul uitsluitend de bijbehorende dop (niet de dop van andere ampullen). Dit om verontreiniging te voorkomen.
- Gebruik voor elk monster een eigen en schoon pipetpipje.
- De microwells niet hergebruiken.
- Voorkom verslechtering van de microwells door mechanische actie (tips/kegels, nozzles).
- De beschrijvingen van symbolen die op de etiketten worden gebruikt, zijn te vinden op de website www.bordier.ch.

Wegwerpbeleid:

Alle materialen zoals gebruikt bij deze test worden gezien als gevaarlijke afvalstoffen. Raadpleeg de landelijke en regionale wet- en regelgeving voor het verwijderen van gevaarlijk afval.

Methode:

Voorkom tijdens de testfase luchtbelvorming in de wells.

Stap 1: Blokkage:

Vul de wells volledig met verdunningsbuffer.

Incubeer gedurende 5 tot 15 minuten bij kamertemperatuur (blokkage).

Verwijder de verdunningsbuffer door afzuigen of leegschudden van de wells boven de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met de monsters:

Vul het eerste well van de eerste strip met 100 µl verdunningsbuffer (serumvrije blanco).

Vul de volgende 3 wells met respectievelijk 100 µl verdund negatief, zwak-positief (drempel) en positief controleserum. Voor testen met meer dan 25 monsters is het advies om de drie laatste wells als duplicaat met controlesera te vullen.

Vul de resterende wells met de verdunde monsters (100 µl per stuk).

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Verwijder de sera en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Vul elk well (inclusief serumvrije blanco) met 100 µl verdund conjugaat.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Vul elk well met 100 µl substraatoplossing.

Bedek de wells met plakband en incubeer gedurende 30 minuten bij 37°C.

Stop de reactie door aan elk well 100 µl stopoplossing toe te voegen.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog zo nodig de onderkant van de wells en verwijder luchtbelletjes. Meet absorptie bij 405 nm binnen 1 uur na toevoegen van de stopoplossing.

Interpretatie:

Trek de waarde van de serumvrije blanco van alle gemeten waarden af. Bereken indien van toepassing de gemiddelde absorptiewaarde van de herhaalde serumcontroles. De test is betrouwbaar als deze aan de volgende criteria voldoet:

- Absorptie (A) van de positieve controle > 1,200
- A van zwakke positieve controle > 10% A van positieve controle
- A van de negatieve controle < 8% van A van de positieve controle
- A van serumvrije blanco < 0,350

Kwaliteitscontroles van de huidige partijen kunt u vinden op onze website: www.bordier.ch.

De titer van het zwak-positief serum 9500-07 (drempel) wordt vastgesteld om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van leishmania en normaal menselijk serum optimaal te duiden. De drempelwaarde van een monster wordt, na aftrekken van de serumvrije blanco, als volgt gedefinieerd:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorptie monster}}{\text{Absorptie zwak-positief (drempel) serum}}$$

Het resultaat is **negatief** als de index van het geanalyseerde monster lager is dan **1,0**. In dat geval is de titer van de IgG-antilichamen tegen **Leishmania infantum**-antigenen klinisch niet significant.

Het resultaat is **positief** als de index van het geanalyseerde monster hoger is dan **1,0**. In dat geval wordt de titer van de IgG-antilichamen tegen **Leishmania infantum**-antigenen als klinisch significant gezien. Dit betekent dat de patiënt in contact is geweest met de parasiet.

Op basis van haar patiëntenpopulatie kan elk laboratorium een grijs gebied bepalen. In geval van twijfelachtige of borderline resultaten is het advies om de test 2-4 weken later met een vers monster te herhalen.

In geval van een positief of twijfelachtig resultaat raden wij aan een bevestigingstest uit te voeren (meestal door western blot) indien een dergelijke test beschikbaar of vereist is volgens de nationale regelgeving.

Analytische prestaties:

Analytische specificiteit:

Een specificiteit van 100% werd gevonden bij 15 sera van patiënten met andere parasitaire infecties. Kruisreactiviteit kan optreden bij sommige andere parasitaire infecties zoals Afrikaanse trypanosomiasis, de ziekte van Chagas en cutane en mucocutane leishmaniasis.

Er werd geen positieve of negatieve interferentie waargenomen met suprafysiologische concentraties hemoglobine, lipiden of bilirubine in sera aangevuld met interfererende stoffen.

Nauwkeurigheid:

Herhaalbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 humane sera in 24 wells in één enkel experiment.

Reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

	Herhaalbaarheid		Reproduceerbaarheid	
	Monster 1	Monster 2	Monster 1	Monster 2
Gemiddeld (absorptie)	1,005	1,766	1,381	2,187
Standaardafwijking (absorptie)	0,061	0,086	0,097	0,114
Variatiecoëfficiënt (%)	6,1	4,9	7,1	5,2

De volgende prestaties kunnen niet worden beoordeeld omdat er geen gecertificeerd referentiemateriaal voor deze analyse bestaat:

- Analytische gevoeligheid (grenzen van detectie en kwantificatie)
- Nauwkeurigheid
- Juistheid
- Meetbereik
- Lineariteit

Klinische prestaties:

Diagnostische gevoeligheid:

Een gevoeligheid van 93% werd gevonden bij 29 sera van immunocompetente patiënten (HIV-) die leden aan viscerale leishmaniasis door *L. infantum*. Een gevoeligheid van 67% werd gevonden bij 21 sera van patiënten met een HIV-*Leishmania* co-infectie. Een negatieve serologie en een positieve kweek kunnen bij deze patiënten voorkomen wanneer zij immuunsuppressief zijn of geïnfecteerd zijn met andere *Leishmania*-soorten zoals *L. major* of *L. braziliensis*.

Diagnostische specificiteit:

Een specificiteit van 100% werd gevonden bij 99 sera van (Zwitserse) bloeddonoren.

Positieve en negatieve voorspellende waarde:

Een PPV van 100% en een NPV van 98% werden gevonden bij de bovengenoemde HIV- populatie en 100% en 93% bij de bovengenoemde HIV+ populatie.

Verwachte waarden bij normale en getroffen populaties:

In een normale populatie van 99 Zwitserse bloeddonoren is de verwachte indexwaarde 0,39. In een getroffen populatie van 13 sera van patiënten met viscerale leishmaniasis is de verwachte indexwaarde 2,64.

Incidenten :

Elk ernstig incident in verband met het apparaat moet worden gemeld aan de fabrikant en aan de bevoegde autoriteit van de lidstaat waar de gebruiker en/of de patiënt is gevestigd.

Beperkingen:

Eén enkele testuitslag is niet voldoende om een infectieziekte te diagnosticeren. Een exacte diagnose dient tevens rekening te houden met de endemische context, klinische voorgeschiedenis, symptomatologie, beeldvorming en serologische data.

De waarde van serologische data bij pasgeborenen en patiënten met immunodeficiëntie is beperkt.

Referenties:

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

