

# RIDASCREEN® Leishmania IgG

Art. Nr. K7321



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDASCREEN® Leishmania IgG ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *Leishmania infantum* in humanem Serum.

Der Test sollte bei begründetem Verdacht auf eine Leishmaniose durchgeführt werden.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Aufgrund der Reaktion des Immunsystems kommt es nach einer Infektion mit *Leishmania* zur Bildung von spezifischen Antikörpern gegen den Erreger. Diese können im Serum mit Hilfe von immunologischen Verfahren nachgewiesen werden. Für die Aussagekraft eines Tests ist dabei neben der Auswahl des verwendeten, Erreger-spezifischen Antigens auch die verwendete Testmethode von Bedeutung.

## 3. Testprinzip

Gereinigtes rekombinantes Antigen von *Leishmania infantum* ist an eine Mikrotiterplatte gebunden. In Patientenproben vorhandene Antikörper binden an die Antigene und werden in einem zweiten Schritt mit einem Enzym-markierten Anti-human-Antikörper (Konjugat) nachgewiesen. Durch das Enzym wird ein farbloses Substrat (TMB) zu einem blauen Endprodukt umgesetzt. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm) innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung.

#### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1:** Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen)

			K7321 IgG
<b>Plate</b>	96 Best.	Mikrotiterplatte; 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) im Halterahmen; beschichtet mit rekombinantem Antigen von <i>Leishmania infantum</i>	X
<b>Diluent</b>	100 ml	Probenpuffer, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, gebrauchsfertig; gelb gefärbt	X
<b>SeroWP</b>	100 ml	Waschpuffer, 10fach konzentriert; NaCl Tris Puffer mit Tween	X
<b>Control IgG +</b> <i>roter Deckel</i>	1,2 ml	IgG Positivkontrolle, Humanserum, gebrauchsfertig	X
<b>Control IgG -</b> <i>farbloser Deckel</i>	1,2 ml	IgG Negativkontrolle, Humanserum, gebrauchsfertig	X
<b>Control IgG  co</b> <i>blauer Deckel</i>	2,5 ml	IgG Cut-off Kontrolle, Humanserum, gebrauchsfertig	X
<b>Conjugate</b> <i>oranger Deckel</i>	12 ml	anti-human IgG Konjugat; gebrauchsfertig; Peroxidase-konjugiertes anti-human IgG Konjugat in stabilisierter Proteinlösung	X
<b>SeroSC</b>	12 ml	Substrat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Tetramethylbenzidin; gebrauchsfertig	X
<b>Stop</b>	12 ml	Stopp-Reagenz 1 N Schwefelsäure; gebrauchsfertig	X

Gefahrstoffangabe gemäß Kennzeichnungspflicht. Weitere Details z.B. Safety Data Sheets (SDS) und andere Produktinformationen auf [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

#### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

Das Testkit ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) fünf Tage haltbar. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der Alu-Beutel, in dem sich die Mikrotiterplatte befindet, ist so zu öffnen, dass der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel zu lagern.

Eine Kontamination der Reagenzien ist ebenso zu vermeiden wie eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat.

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

### 6.1. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

### 6.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Inkubator 37 °C
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina
- Messzylinder (1000 ml)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Hypochloritlösung

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften!

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Positivkontrolle, Cut-off Kontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HbsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben und alle Materialien, die mit ihnen in Berührung kommen, als potentiell infektiös behandelt und entsprechend den jeweiligen nationalen Sicherheitsbestimmungen gehandhabt werden.

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

Der Test ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Nach der Blutentnahme sollte zur Vermeidung einer Hämolyse das Serum möglichst schnell vom Blutkuchen getrennt werden. Die Proben sind bis zur Testung kühl oder gefroren zu lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt

zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

**Tab. 2:** Probenlagerung

unverdünntes Serum		verdünntes Serum
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 Woche	> 1 Woche	7 Stunden

## 9. Testdurchführung

### 9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Mikrotiterstreifen sind erst nach Erreichen der Raumtemperatur dem Alu-Beutel zu entnehmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Nach dem Gebrauch ist das Kit sofort wieder bei 2 - 8°C zu lagern.

Es sollte nur so viel Reagenz entnommen werden, wie für die Durchführung des Tests benötigt wird. Überschüssiges Reagenz darf nicht in die Gefäße zurückgegeben werden, da dies zu einer Kontamination führen kann.

Die Mikrotiterstreifen können nicht mehrfach verwendet werden. Reagenzien und Mikrotiterstreifen dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

Waschpuffer, Probenpuffer, Stopplösung und Substrat sind nicht testspezifisch; sie können auch bei den anderen RIDASCREEN® ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Parasiten verwendet werden.

### 9.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates **SeroWP** wird mit 9 Teilen destillierten Wassers gemischt. Hierfür werden 100 ml des Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen, bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) fünf Tage haltbar.

### 9.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer **Diluent** 1:50 verdünnt.

z. B. 10 µl Serum + 490 µl **Diluent**

## **Achtung!**

**Negativkontrolle, Cut-off Kontrolle und Positivkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.**

### **9.4. Erste Inkubation**

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen negativ **Control IgG | -**, positiv **Control IgG | +** und Cut-off **Control IgG | co** jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert. Die Cut-off Kontrolle **Control IgG | co** sollte in Doppelbestimmung mitgeführt werden.

### **9.5. Waschen**

Die Kavitäten sollten in einen Abfallbehälter mit Hypochloritlösung zur Desinfektion entleert werden. Danach wird die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 5 mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen auf einer unbenutzten Stelle des Papiers zu sorgen.

**Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten. Nach dem Waschen sollte die Platte auf saugfähigem, sauberem Papier ausgeklopft werden, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.**

### **9.6. Zweite Inkubation**

Zugabe von 100 µl des Anti-human IgG Konjugates **Conjugate** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25 °C) inkubiert.

### **9.7. Waschen**

5maliges Waschen gemäß Pkt. 9.5.

### **9.8. Dritte Inkubation**

Zugabe von je 100 µl Substrat **SeroSC** in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl Stopp-Reagenz **Stop** in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach Beendigung der Reaktion gemessen (Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

## 10. Qualitätskontrolle - Anzeichen für Reagenzienverfall

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positiv, Negativ und Cut-off Kontrolle mitzuführen. Die Cut-off Kontrolle wird in Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert aus den beiden Einzelmessungen gebildet. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 25 % vom Mittelwert ab, muss der Test wiederholt werden. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn die Extinktionswerte (OD) der Kontrollen folgende Kriterien erfüllen:

**Tab. 3:** Kriterien für die Qualitätskontrolle

	OD
Negativ Kontrolle	< 0,15
Cut-off Kontrolle	0,2 – 0,5
Positiv Kontrolle	≥ Index 20

Eine Abweichung von den geforderten Werten kann ebenso wie eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Kavitäten ein Hinweis auf einen Reagenzienverfall sein.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

## 11. Auswertung und Interpretation

### 11.1. Berechnung des Proben-Index

1. Der Extinktionsmittelwert der Cut-off Kontrolle wird berechnet.
2. Division der Extinktion der Patientenprobe durch den berechneten Extinktionsmittelwert der Cut-off Kontrolle.

Beispiel:                    Cut-off Kontrolle 1      OD = 0,440  
                                   Cut-off Kontrolle 2      OD = 0,420  
                                   Proben                      OD = 1,591

$$\text{Mittelwert cut-off Kontrolle} = \frac{OD \text{ Cut-off } 1 + OD \text{ Cut-off } 2}{2} = \frac{0,44+0,42}{2} = 0,43$$

$$\text{Proben Index} = \left( \frac{OD \text{ Probe}}{OD \text{ Mittelwert cut-off Kontrolle}} \right) * 10 = \left( \frac{1,591}{0,43} \right) * 10 = 37$$

**Tab. 4:** Bewertung des Proben-Index

	negativ	grenzwertig	positiv
Proben-Index	< 9	9 - 11	> 11

## 12. Grenzen der Methode

Der RIDASCREEN® Leishmania IgG Enzymimmunoassay weist spezifisch IgG-Antikörper gegen *Leishmania infantum* nach. Er sollte bei begründetem Verdacht auf eine Leishmaniose durchgeführt werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild und anderen diagnostischen Befunden zu interpretieren.

Antikörpersignale sind abhängig von der Lokalisation des Parasitenbefalls und können von Patient zu Patient variieren.

Grenzwertige und schwach positive Ergebnisse können in folgenden Fällen vorkommen:

- bei Personen, die in endemischen Gebieten von infizierten Phlebotomen gestochen wurden und ohne Manifestation der Infektion niedrige Antikörpertiter aufweisen
- bei Personen, die eine asymptomatische Infektion durchlaufen oder gerade durchlaufen haben, so dass sie noch niedrige Antikörpertiter aufweisen
- bei Personen, die in der Vergangenheit erkrankt waren und noch Resttiter aufweisen
- bei Personen in der Frühphase der Erkrankung
- aufgrund nicht identifizierbarer und unspezifischer Faktoren

Diese Fälle sollten durch Nachtestung einer weiteren Probe und unter Einbeziehung der klinischen Symptome sowie anderer diagnostischer Methoden weiter untersucht werden. Kann weiterhin keine genaue Diagnose erstellt werden, sollte der Test nach zwei bis vier Wochen mit einer neuen Probe wiederholt werden. Mittel und hoch positive Ergebnisse können bei Personen vorkommen, die akut erkrankt sind oder gerade die Erkrankung durchlaufen haben. Auch nach länger zurückliegenden

Infektionen können noch höhere Antikörpertiter vorkommen. In unklaren Fällen ist das Ergebnis unter Berücksichtigung von Anamnese, klinischer Symptomatik und anderer diagnostischer Methoden zu interpretieren.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Leishmaniose nicht aus. Zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion kann der Antikörpertiter so gering sein, dass der Test negativ ausfällt. Besteht anamnestisch ein begründeter Verdacht, sollte nach zwei bis vier Wochen eine weitere Serumprobe untersucht werden.

In Südamerika wurde in manchen Fällen eine Kreuzreaktion mit Seren, die Antikörper gegen

*T. cruzi* (Chagas-Krankheit) enthielten, beobachtet. Hierauf muss bei der Verwendung des Tests in Gebieten Südamerikas, in denen die Chagas-Krankheit endemisch vorkommt, geachtet werden.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

### 13. Leistungsmerkmale

**Tab. 5:** Inter-Assay-Varianz (n = 30)

Inter-Assay-Varianz	IgG	
	Index	VK
Serum 1	44,7	5,8 %
Serum 2	15,4	9,6 %
Serum 3	13,1	8,3 %
Serum 4	0,6	n/a

**Tab. 6:** Intra-Assay-Varianz (n = 23)

Intra-Assay-Varianz	IgG	
	Index	VK
Serum 1	39,1	3,0 %
Serum 2	15,7	3,6 %
Serum 3	12,3	2,0 %
Serum 4	0,2	n/a

**Tab. 7:** Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu drei anderen, kommerziellen ELISA

	IgG
Sensitivität	100 %
Spezifität	100 %

**Tab. 8:** Ergebnisse mit 200 untersuchten Blutspendeseren aus einem Blutspendezentrum in Deutschland

200 Blutspendeseren	IgG
negativ	100 %
grenzwertig	0 %
positiv	0 %

## 14. Versionsübersicht

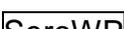
Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2017-12-15	Release version

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

	Mikrotiterplatte
	Probenverdünnungspuffer
	Waschpuffer 10x
	Positivkontrolle IgG
	Negativkontrolle IgG
	Cut-off Kontrolle
	Anti-human IgG Konjugat
	TMB Substrat
	Stopp-Reagenz

## 16. Literatur

1. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 605-609 (1966).
2. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 490-505 (1967).
3. *Bray, R.S.*, Ecol. Dis., 4, 257-267 (1982).
4. *Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and Lanotte, G.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 213-218 (1978).
5. *Kager, P.A., Rees, P.H., Welde, B.T., Hockmeyer, W.T. and Lyerly, W.H.*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 556-559 (1981).
6. *Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 569-596 (1983).
7. *Low-A-Chee, R.M., Rose, P. and Ridley, D.S.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 255-260 (1986).
8. *Ranque, J. and Quilici, M.*, Journal of Parasitology, 56, 277-278 (1970).