

LEISHMANIA IFA IgG

Für die *In vitro* diagnostik

PLEDOG: Kit für die indirekte Antikörper-Immunfluoreszenz (IFA) zur Bestimmung von *Leishmania infantum* IgG-Antikörpern in humanem Serum/Plasma.

EINLEITUNG:

Leishmania infantum ist ein kausaler Erreger von Kala-Azar oder viszeraler sowie kutaner Leishmaniose. Die parasitäre Infektion ist in der Mittelmeerregion endemisch. Kala-Azar ist eine ernsthafte Erkrankung mit Fieber, Splenomegalie, Anämie, Gewichtsverlust und Leukopenie, sie kann Fieber unbekannten Ursprungs verursachen. Eine Infektion mit *L. infantum* kommt bei AIDS-Patienten sehr häufig vor. Der IFA ist ein aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität allgemein für die serologische Diagnose der Krankheit in ihrer systemischen Form anerkannter Test. Bei immunsupprimierten Patienten kann jedoch bei keinem Antikörpernachweistest eine hohe Sensitivität erwartet werden.

PRINZIP DES TESTS:

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Reaktion der Antikörper der Probe mit dem an die Oberfläche des Objektträgers gebundenen Antigen. In der Probe vorhandene spezifische Antikörper reagieren mit dem Antigen, nicht-bindende Immunglobuline werden im Waschprozess beseitigt. Im nächsten Schritt reagiert der Antigen-Antikörper-Komplex mit Fluorescein- markiertem Antihumanglobulin und wird durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Alle Reagenzien mit Ausnahme von PBS werden gebrauchsfertig geliefert. Die Kit-Bestandteile sind zur leichteren eindeutigen Identifizierung mit einer Nummer versehen. Im Versuchsverfahren werden die Nummern der in jedem Abschnitt zu verwendenden Reagenzien angegeben.

BESTANDTEILE DES KITS:

- 1 VIRCELL LEISHMANIA SLIDE: 10 Objektträger zu je 10 Feldern mit promastigote Formen von *L. infantum*, in RPMI-1640-Medium gewachsen. Die Strains werden mit Formaldehyd passiviert und mit Aceton fixiert.
- 2 VIRCELL PBS: 1 Ampulle zur Zubereitung von 1 l PBS pH 7,2.
- 3 VIRCELL LEISHMANIA IgG POSITIVE CONTROL: 200 µl positives Testserum für IgG (enthält Natriumazid).
- 4 VIRCELL LEISHMANIA NEGATIVE CONTROL: 200 µl negative Testserum (enthält Natriumazid).
- 5G VIRCELL ANTI-HUMAN IgG FITC CONJUGATE: 2 Ampullen mit 1,1 ml Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgG-Konjugat in Phosphatpuffer mit Eiweißstabilisator, Evans-Blau und Natriumazid.
- 6 VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml Eindeckmedium: gepuffertes Glycerol (enthält Natriumazid).

Bei 2-8°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

Geeignete Präzisionspipetten.
Inkubator/temperierbares Bad.
Destilliertes Wasser.
24x60 mm großes Objektdeckglas.
Fluoreszenzmikroskop und nach Herstellerempfehlungen geeignete Filter.
Feuchte Kammer.

LAGERBEDINGUNGEN:

Das Kit ist bei der angegebenen Temperatur bis zum Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfalldatums. Das angegebene Verfalldatum gilt immer dann, wenn die Komponenten geschlossen bei der angegebenen Temperatur gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität
Rekonstituierte PBS	4 Monate bei 2-8°C, stets innerhalb des Verfalldatums
VIRCELL SLIDE	Nach dem Öffnen am gleichen Tag verwenden
Übrige Bestandteile	Datumsangabe auf Verpackung bei 2-8°C

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Alle Reagenzien zur Vermeidung mikrobiischer Verunreinigungen unter aseptischen Bedingungen verwenden. Nur zur Testdurchführung erforderliche Menge an PBS, Kontrollen und Konjugat benutzen. Restliche Lösung niemals in die Ampullen zurückgeben. Die PBS muss nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C gelagert und darf bei Trübung nicht verwendet werden.

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.

EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur PBS, Objektträger und Eindeckmedium sind zu gleichwertigen Substanzen anderer Artikelnummern und Chargen von IFA VIRCELL kompatibel. Die übrigen Bestandteile sind unter verschiedenen Kits kompatibel, wenn deren Chargennummer übereinstimmt.
3. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
4. Keine beschädigten Kits verwenden.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Konjugat und Kontrollen dieses Kits enthalten Material tierischen Ursprungs. Die Kontrollen enthalten zudem Substanzen humanen Ursprungs. Obwohl die Humanserum-Kontrollen dieses Kits auf Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg), Hepatitis C Antikörper und Human Immunodeficiency Virus Antikörper getestet und für negativ befunden wurden, sollten Kontrollseren und Patientenproben als potentiell



infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Vertiefungen der Titerplatte sind mit inaktiviertem Antigen von *L. infantum* beschichtet. Trotzdem sollten auch sie als potentiell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Bestandteilen versichern. Alle Materialien sollten wie potentiell infektiöse Stoffe entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von klinischem Material.

7. Aufgrund des Natriumazidgehalts (Konzentration <0.1%) ist der Kontakt von Konjugat, Eindeckmedium und Kontrollen mit Säuren und Schwermetallen zu vermeiden.

8. Aufgrund des Glycerolgehalts ist der Kontakt des Eindeckmediums mit Säuren zu vermeiden. Keinen hohen Temperaturen aussetzen.

9. Evans-Blau (Konzentration <0.1%) ist krebserregend. Haut- und Augenkontakt vermeiden. Betroffene Fläche bei Kontakt mit Wasser abwaschen und einen Arzt rufen.

10. Nur die in diesem Prospekt beschriebenen Protokolle benutzen. Entsprechen die in diesem Test eingesetzten Inkubationsintervalle oder -temperaturen nicht den Angaben, können die Ergebnisse fehlerhaft sein.

11. Die Kreuzverunreinigung durch Serum verschiedener Patienten auf einem Objektträger kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zur Vorbeugung erforderliche Vorkehrungen treffen.

12. Die Optik des Mikroskops, die Wartung und die Art der Lichtquelle können die Fluoreszenzqualität beeinträchtigen.

13. Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich Raumtemperatur aussetzen.

14. Jeder Objektträger ist nur einmal zu benutzen. Er darf weder geteilt, noch dürfen unbenutzte Felder wiederverwendet werden.

15. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG:

Das Blut muss unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktionstechniken von erfahrenem Personal entnommen werden. Zur Vermeidung von Probenverunreinigungen wird der Einsatz aseptischer oder steriler Techniken empfohlen. Die Sera sind bei 2-8°C gekühlt zu lagern, wenn sie innerhalb der sieben auf die Entnahme folgenden Tage verarbeitet werden. Verzögert sich die Verarbeitung, sind sie bei -20°C einzufrieren, wobei unnötiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte, da dies zu einer Verringerung des Immunglobulintiters und insbesondere von IgM führen könnte. Keine hyperlipämischen oder verunreinigten Sera verwenden. Partikel aufweisende Sera können durch Zentrifugieren geklärt werden.

TESTVORBEREITUNG:

Das einzige vor der Testdurchführung vorzubereitende Reagenz ist die PBS. Hierfür den Inhalt von Ampulle 2 auf 1 Liter destilliertes Wasser zugeben und bis zur vollständigen Auflösung schütteln. Nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C aufbewahren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Reagenzien und Objektträger vor deren Öffnung auf Raumtemperatur bringen.

2. 1/40 und 1/80-Verdünnung der Sera vornehmen, hierfür 10 µl Serum in 390 µl PBS 2 geben; als 1/40. Lösung beschriften,

mit 50 µl PBS (1/80-Lösung) doppelt verdünnen. Die Testsera 3 und 4 dürfen nicht verdünnt werden.

3. In zwei Felder von Objektträger 1 20 µl der 1/40 und 1/80-Verdünnung geben. Ebenso mit den Positiv- und Negativ-Kontrollen 3 und 4 verfahren.

4. 30 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.

5. Objektträger kurz mit PBS spülen (vermeiden, PBS direkt auf die Felder zu schütten). Objektträger 10 Minuten lang in PBS tauchen. Leicht mit destilliertem Wasser spülen.

6. Objektträger 1 abtrocknen lassen.

7. Auf jedes Feld 20 µl Anti-Human-IgG-Lösung 5G zugeben. (Erfordert keine Verdünnung).

8. Schritte 4, 5 und 6 wiederholen.

9. Auf jedes Feld einen kleinen Tropfen Eindeckmedium 6 zugeben und Deckglas aufsetzen.

10. So schnell wie möglich bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Andernfalls bis zur Betrachtung höchstens 24 Stunden lang bei 2-8°C dunkel lagern.

11. Für den Fall der Positivität bei diesen Screening-Verdünnungen Sera erneut unter Verwendung von bis 1/640-Verdünnungen untersuchen.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, bevor einer Freigabe unter Spezifikationen zugestimmt wird, die strenger als die für den Anwender sind. Die endgültigen Ergebnisse der Qualitätskontrolle jedes einzelnen Artikels sind erhältlich.

Dem Kontrollmaterial liegen als Referenz nachweislich intern geprüfte Serumplatten zugrunde.

TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

In jeden Versuchsdurchgang sollte das positive und negative Testserum aufgenommen werden. Das gestattet die Validierung des Tests und des Kits. Das vorhandene Fluoreszenzmuster sollte folgendermaßen aussehen:

Positive Kontrolle: Periphere zytoplasmatische und flagelare Fluoreszenz.

Negative Kontrolle: Rote Zellschablone.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Der Serumtiter ergibt sich aus der höchsten Verdünnung, bei der eine positive Reaktion festzustellen ist.

Die Reaktion ist positiv, wenn periphere zytoplasmatische und flagelare Fluoreszenz festgestellt wird.

Die Reaktion ist negativ, wenn eine rote Zellschablone festgestellt wird.

Von den in der dieser Beilage definierten Fluoreszenzmustern abweichende Ergebnisse dürfen nicht als positiv interpretiert werden.

Das Verhalten von IgG- und IgM-Antikörpern bei Primär- und Reinfektionen ist unterschiedlich. Bei einer Primärinfektion treten IgG und IgM in fast allen Fällen auf (IgM erscheint vor IgG). Bei einer Reinfektion treten in allen Fällen keine IgM-Antikörper auf und die IgG-Erkennung ist die einzige Möglichkeit der Diagnose. Bei vielen Krankheiten können im ganzen Leben des Patienten hohe IgG-Titer bestehen, während sich IgM im Allgemeinen nur zwei oder drei Monate nach der Krankheit im Serum hält. Sie sind daher ein wirkungsvoller Marker für eine kürzliche Infektion.

Das Auftreten von Antikörpern bei Titer 1/40 verweist zwar auf eine Infektion, doch ist die Titrierung der Sera dieser



Verdünnung zweckmäßig. Zur Bestätigung dieser serologischen Befunde ist die Bestätigung durch Untersuchung der Knochenmasse des Parasiten durch Färbung oder Kultur erforderlich.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Der Kit ist für die Untersuchung von humanem Serum/Plasma.
2. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Insbesondere das korrekte Pipettieren der Probe und der Reagenzien sowie sorgfältiges Waschen und die Einhaltung der angegebenen Inkubationszeiten sind für die Genauigkeit der Ergebnisse essenziell.
3. Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.
4. Dieser Test zeigt nicht den Infektionsort. Er kann eine Erregerisolierung nicht ersetzen.
5. Wenn kein signifikantes Ansteigen des Antikörper-Niveaus vorhanden ist, bedeutet dies nicht, dass eine Infektion ausgeschlossen werden kann.
6. Sehr früh im Verlauf einer Infektion genommene Proben können eventuell keine erkennbaren IgG-Anteile enthalten. In diesen Fällen wird die Durchführung eines Versuchs zur IgM-Bestimmung oder eine zweite Probennahme nach Ablauf von 14 bis 21 Tagen empfohlen, die dann zur Bestimmung einer Serokonversion parallel zur Originalprobe zu testen ist.
7. Bei der Erkennung von IgG bei Neugeborenen erzielte Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, da Mutter-IgG vor der Geburt passiv von der Mutter auf den Fetus übertragen wird. Bei Kindern unter sechs Monaten ist die IgM-Bestimmung der bessere Infektionsindikator.
8. Für die Diagnose einer Infektion sollten niemals nur die Ergebnisse der Antikörperbestimmung einer einzigen Probe herangezogen werden. Eine paarweise Testung der Proben (akut und latent) sollte erfolgen, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen.
9. Bei der viszeralen Leishmaniose weist die Immunantwort eine beträchtliche Stärke auf und kann unter Einsatz der IFA-Techniken angemessenen gemessen werden. Deren Hauptnachteil ist die Kreuzreaktion mit *Trypanosoma cruzi*, weshalb die serologischen Ergebnisse in endemischen Gebieten dieses Parasiten durch alternative Techniken bestätigt werden müssen.
10. Bei Patienten mit antinukleären Antikörpern kann eine Fluoreszenzschablone auf Kinetoplast und Nucleus auftreten, die nicht als spezifisch und daher nicht als Krankheitsindiz angesehen werden darf.
11. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.
12. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSDATEN:

• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:

Gegenüber von der indirekten Antikörper-Immunfluoreszenz einer anderen Handelsfirma wurden 141-Serum/-Plasma-Proben mit LEISHMANIA IFA IgG getestet und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
IgG	141	100%	100%

Die Sera, die keine spezifische Reaktion aufwiesen, wurden aus den Endberechnungen ausgeschlossen.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurde 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und unter gleichen Arbeitsbedingungen einzeln in Fünfergruppen in einem einzigen von der gleichen Person durchgeführten Versuch pipettiert.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurden 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und einzeln unter 5 verschiedenen Bedingungen pipettiert, bei denen sich die Person oder der Durchführungstag änderten.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

Gegenüber *Toxoplasma gondii* (taxonomische Beziehung) wurden 3 als positiv bekannte Proben ausgetestet.

Die getesteten Proben ergaben negative Ergebnisse und bewiesen dabei die spezifische Reaktion des Versuchs ohne von den beschriebenen Stoffen verursachte Kreuzreaktion oder Interferenzen.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLE:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-°C lagern
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	<X> Vertiefungen



LITERATUR:

1. Alvar, J., C. Canavate, B. Gutierrez-Solar, M. Jimenez, F. Laguna, R. Lopez-Velez, R. Molina, and J. Moreno. 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10:298-319.
2. Badaro, R., T. C. Jones, E. M. Carvalho, D. Sampaio, S. G. Reed, A. Barral, R. Teixeira, and W. D. Johnson Jr. 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154:1003-11.
3. Edrissian, G. H., P. Darabian, Z. Zovein, M. A. Seyedi-Rashti, and A. Nadim. 1981. Application of the indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 75:19-24.
4. Krampitz, H. E., G. Weiland, T. Loscher, and L. Prufer. 1981. Evaluation of antigens for the serodiagnosis of kala-azar and oriental sores by means of the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT). *Infection* 9:264-7.
5. Montalban, C., J. L. Calleja, A. Erice, F. Laguna, B. Clotet, D. Podzamczar, J. Cobo, J. Mallolas, M. Yebra, and A. Gallego. 1990. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the Study of Leishmaniasis in AIDS. *J Infect* 21:261-70.
6. Oren, R., L. F. Schnur, D. Ben Yehuda, V. Mayner, E. Okon, and E. A. Rachmilewitz. 1991. Visceral leishmaniasis: a difficult diagnosis and unusual causative agent. *J Infect Dis* 164:746-9.
7. Pearson, R. D., D. A. Wheeler, L. H. Harrison, and H. D. Kay. 1983. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* 5:907-927.
8. Piarroux, R., F. Gambarelli, H. Dumon, M. Fontes, S. Dunan, C. Mary, B. Toga, and M. Quilici. 1994. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 32:746-9.
9. Sinha, R., U. Datta, and S. Sehgal. 1993. Importance of bone marrow culture for diagnosis of Kala azar. *Scand J Infect Dis* 25:787-9.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:
customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 2017/04

