

LEISHMANIA CE



Western Blot IgG

In vitro diagnostisk Immunoblot-analyse
Semi-automatiseret / manuel teknik

LES-WB24G : 24 tests

LES-WB12G : 12 tests

LES-WB96G : 96 tests

BRUGERVEJLEDNING

Find mere information og brugsanvisning på dit sprog på vores websted
www.ldbiodiagnostics.com

Tilsigtet brug

LEISHMANIA Western Blot (WB) IgG er en kvalitativ test til engangsbrug af serologisk IgG diagnose ved immunblot analyse af leishmaniase beregnet til bekræftende testning af et positivt eller tvetydigt resultat opnået ved brug af standard screeningstests.

Testens princip

Western Blot-teknik:

Når antigener af *Leishmania infantum* er separeret vha. elektroforese, er de bundet via elektroblotting til overfladen af en nitrocellulosemembran (kaldet overføreren) opskåret i 24 strimler nummereret fra 1 til 24.

Udførsel af testen

Hver prøve, der skal testes, inkuberes separat med en strimmel. De specifikke antistoffer, der potentielt er til stede i prøven, binder sig selv selektivt til antigenerne. Det alkanline fosfatase-anti human-IgG konjugat binder derefter sig selv til de bundne antistoffer. Til sidst reagerer immunkomplekserne med substratet. De antigener, der genkendes af de specifikke antistoffer af typen IgG til stede i prøverne, vises som lilla tværgående bånd.

Reagenser leveret med sættet

Standard: pakke med 24 tests (#LES-WB24G)

italic: pakke med 12 tests (#LES-WB12G) – **bold:** Pakke med 96 tests (#LES-WB96G).

ID	Antal	Beskrivelse	Sammensætning
R1	1	Mappe(r) med 24 (12, 4x24) STRIMLER: udkåret + farvet Standarder. (Hver mappe og hver overfører er identificeret ved et unikt serienummer)	Sensitiseret nitrocellulose. Farvet molekylvægt (kDa): Blå: 250, Blå: 150, Blå: 100, Pink: 75, Blå: 50, Grøn: 37, Pink: 25, Blå: 20, Blå: 15, Gul: 10.
R2	1	Hætteglas med 30 (30, 125) ml PRØVEBUFFER (klar til brug – lyserød opløsning).	Buffer + overfladeaktivt stof.
R3	1	Hætteglas med 30 (30, 2x60) ml ANTI IgG KONJUGAT (klar til brug – blå opløsning).	Buffer + antihuman IgG polyklonal gedeserum konjugeret med alkalinfosfatase + NaN3 (<0,1 %) + stabilisatorer.
R5	1	Hætteglas med 30 (30, 125) ml SUBSTRAT (klar til brug – uigennemsigtigt brunt hætteglas).	Buffer + NBT + BCIP + stabilisatorer.
R6	1	Hætteglas med 60 (60, 250) ml VASKEKONCENTRAT 10X BUFFER (Fortyndes 10 gange i destilleret vand – farveløs opløsning).	Buffer + overfladeaktivt stof.
R10	1	Rør med 200 (200, 2x200) µl POSITIVT KONTROLSERUM (klar til brug – rød hætte).	Buffer og samling af humane sera positive for <i>Leishmania</i> serologi + NaN3 (<0,1 %) + stabilisatorer.

R1: Bogstavet før hvert båndnummer er specifikt for parameteren.

R2, R3, R5 og R6 er fælles for alle sæt og har et unikt lotnummer, der kun afhænger af deres produktionsdato.

Det anbefales at udføre tests med flere parametre (se LDBIO serien af immunblot) for at begrænse antallet af åbne hætteglas og sikre bedre kvalitetskontrol.

R10 er kalibreret i immunoblot ifølge et referencelot og er kun dedikeret til denne teknik.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre.

EUH 210 Sikkerhedsdatablad fås på anmodning såvel som på vores websted www.ldbiodiagnostics.com.

Yderligere materialer påkrævet men ikke leveret

- Inkubationsbakker af polypropylen med flere kanaler til miniblots (nr. WBPP-08 eller tilsvarende).
- Rysteplade til immunblotter, sugesystem til væsker (rør med nummer WBPP-08, som vi leverer, kan tømmes ved blot at vende dem på hovedet).
- Rør og materialer til udtagning af prøver, graduerede cylindere, tilpassede beholdere. Automatiske pipetter, mikropipetter og engangsspidser (volumener på 25 µl, 1,2 ml og 2 ml).
- Destilleret eller demineraliseret vand. Trækpapir (f.eks. Whatman filtrerpapir), gennemsigtig klæbetape.
- Handsker, pincetter til at håndtere strimlerne, saks eller skalpel, flad gennemsigtig lineal.

Bemærk: Vores reagenser kan bruges i en mekanisk immunblotprocessor. **Mulig kemisk kontaminering af vores reagenser skal omhyggeligt undgås, hvis processoren deles med reagenser fra en anden producent** (kendt eksempel: kontaminering med TWEEN 20) og bakteriel kontaminering. Ekstra hætteglas til processoren. Efter forarbejdning må de overskydende brugte reagenser ikke kommes tilbage i de oprindelige hætteglas.

Opbevaring og stabilitet

Opbevares mellem 2 og 8 °C. Reagenserne fra sættet er stabile indtil udløbsdatoen angivet på den ydre karton og hætteglasetiketterne. Brug ikke forurenede eller uklare reagenser. Vaskebuffer fortyndet til 1/10 er stabil i 2 måneder ved +2 til +8 °C og en uge ved stuetemperatur.

Forsigtighedsregler

Sikkerhed

- Kun til *in vitro* brug. Kun til professionel brug. Kun for teknisk uddannet personale. Håndteres i henhold til god laboratoriepraksis, og alle reagenser og prøver skal anses for at være potentielt toksiske og/eller smittefarlige.
- Brug en laboratoriekittel, handsker og briller. Undlad at drikke, spise eller ryge i laboratoriet. Undlad at pipettere med munden.
- Den positive kontrol er et serum af human oprindelse, der er blevet inaktiveret for HIV 1 og 2, hepatitis B og hepatitis C-vira. Det skal imidlertid håndteres som et potentielt smittefarligt produkt.
- Substratet indeholder en blanding af NBT og BCIP, der er toksisk ved kontakt (hud og slimhinder) og inhalation.
- Reagenserne indeholder natriumazid, som kan danne eksplosive metalliske salte med bly og kobber. Skyl alt spild med vand.
- Bortskaf affald (prøver, spidser, rør, vaskevæske, brugt reagens ...) i henhold til god praksis anvendt i branchen og gældende regulativer i landet.
- Enhver alvorlig hændelse skal være genstand for en erklæring til producenten og den kompetente myndighed.

Forsigtighedsregler

- Læs og fortolk resultaterne under direkte hvidt lys.
- Det er at foretrække at anvende alle reagenser fra samme batch. Hvis der anvendes forskellige batches, skal sporbarheden sikres.
- Anvend strimlerne i numerisk rækkefølge. Undlad at blande strimler fra forskellige serienumre; anvend overførslerne i rækkefølge. Vedtag en specifik distributionsplan inden påbegyndelse af testen.
- Undlad at berøre strimlerne med fingrene; brug pincetter.
- Reagenserne skal blandes godt før brug, især den koncentrerede vaskebuffer.
- Luk hætteglassene efter brug; må ikke anvendes hvis et stof utilsigtet blev introduceret i reagenserne. Undlad at bruge reagens fra et hætteglas, der viser tegn på lækage. Undlad at bruge en uklar eller grumset opløsning.
- Brug kun engangspipettespidser. Undgå kontaminering i kanalerne. Hold øje med dannelse af skum eller bobler i pipettespidserne (bakteriel kontamination af reagenshætteglas).
- Rengør kun inkubationsbakker med destilleret vand (brug aldrig sæbe eller blegemiddel).
- Udeladelse af en prøve eller distribution af et utilstrækkeligt volumen kan medføre et negativt eller positivt testresultat, uanset dets faktiske status.

Indsamling af prøver

Indsaml prøverne aseptisk i tørre rør. Der kræves et minimum på 25 µl serum.

Hold prøverne ved 2-8 °C, indtil de er forarbejdet. Hvis de skal opbevares mere end en uge, skal prøverne fryses ved -20 ±5 °C. En kontamineret prøve må ikke anvendes. Undgå at fryse og optø prøverne gentagne gange.

Selv om der ikke er observeret nogen bestemt krydsreaktion med hæmolyseret, ikterisk eller lipid sera, anbefales det at fortolke resultaterne opnået med brug af sådanne prøver forsigtigt.

Klargøring af reagenser

Vaskebuffer: Til 4 tests fortyndes 10 ml vaskekoncentrat 10X (**R6**) i 90 ml destilleret eller demineraliseret vand i en ren flaske. Vær omhyggelig med at blande den fortyndede buffer godt.

Testprocedure

Bemærk: Det anbefales at udføre tests med flere parametre (se LDBIO serien af immunblot) for at begrænse antallet af åbne hætteglas og sikre bedre kvalitetskontrol.

1. Forbered en distributionsplan for prøverne og C+ positiv kontrol (**R10**).

Kun brugen af denne kontrol gør det muligt at validere håndteringen teknisk og for et givet serienummer at identificere de afslørede specifikke bånd. En C+ -stribe kan ikke bruges til at fortolke resultaterne af strimler med forskelligt serienummer.

2. Skær det påkrævede antal strimler (R1) med en skalpel og en ren og tør, flad, gennemsigtig lineal, idet den blå positioneringsstreg holdes på strimlerne: Hold strimlerne på plads med linealen og skær dem på siden af stammen (tallene kan ses gennem linealen).
3. Fordel 1,2 ml af prøvebufferen (R2) i hver kanal i henhold til den vedtagne plan.
4. Anbring de nummererede strimler i kanalerne i numerisk rækkefølge: Lad strimlerne blive rehydrerede i bufferens overflade i ca. 2 minutter med tallet synligt på oversiden. Ryst DEREFTER bakken forsigtigt for at nedsænke dem helt i bufferen.
5. Fordel prøverne og de(n) positive kontrol(ler): i henhold til distributionsplanen, med 25 µl pr. kanal. Ryst forsigtigt bakken efter hver distribution. Anbring bakken på en rysteplade.
Inkubér i 90 min. ± 5 min. ved 20-26°C.
6. Vasketrin: Tøm indholdet i kanalerne med en Pasteur-pipette eller ved at vende inkubationsbakken på hovedet. Kom 2-3 ml fortyndet vaskebuffer i hver kanal. Inkubér på rystepladen i 3 minutter. Gentag 2 gange og tøm derefter indholdet ud af kanalerne. Sørg for, at strimlerne ikke vendes under disse trin.
7. Kom 1,2 ml anti-IgG-konjugat (R3) i hver kanal. Anbring bakken på rystepladen.
Inkubér i 60 min. ± 5 min. ved 20-26°C
8. Vasketrin: Gentag trin 6.
9. Fordel 1,2 ml NBT/BCIP-substrat (R5) i hver kanal. Anbring på rystepladen og beskyt mod direkte lys.
Inkubér i 60 min. ± 5 min. ved 20-26°C.

Monitorér farveudviklingen, uanset parameter. Udviklingen kan stoppes, hvis strimlens baggrundsfarve bliver så mørk, at aflæsning er svær (kvaliteten af vasketrinnene har en grundlæggende indflydelse på baggrundsfarven). Bemærk, at strimlerne bliver lysere, når de tørrer.

10. Stop reaktionen ved at aspirere substrat med en Pasteur-pipetter eller ved at vende inkubationsbakken om og komme 2 ml destilleret vand i kanalerne. Gentag dette sidste vasketrin én gang til.
11. Tørring af strimlerne: Stadig med vand i kanalerne tages strimlerne i den nummererede ende med pincetten og anbringes på et Whatman-trækpapir med nummeret synligt. Lad lufttørre. Farven på strimlerne vil lysne naturligt, når de tørrer. Fortolkning må kun foretages, efter tørring er komplet.
12. Opbevaring: Overfør strimlerne til et ark papir, som vil blive brugt til at arkivere dem. Ret positioneringslinjerne ind. Hold dem på plads med en flad lineal, og fastgør toppen af strimlerne med gennemsigtig klæbebånd.

For at opnå en god fortolkning skal strimlerne arrangeres efter overførsel og i deres numeriske rækkefølge, med højst et par millimeters mellemrum. Det er ikke pålideligt at sammenligne strimler med for stort mellemrum (f.eks. nr. 2 med nr. 15). **Det er farligt** (falske resultater) at sammenligne strimler fra forskellige sæt (strimler med forskellige serienumre).

Kvalitetskontrol og fortolkning

Serumkontrollen (R10) leveret med sættet skal systematisk inkluderes i alle immunblotserier. Den viser den typiske profil og muliggør teknisk validering af god udførsel af testen (båndene skal fremstå meget tydeligt på strimlen) og at kalibrere den/det nøjagtige position og aspekt for de specifikke bånd for at muliggøre fortolkning af resultaterne af strimlerne fra den samme overførsel (samme serienummer).

Nota Bene: Den positive kontrolprofil (R10) kan variere afhængigt af lotnummeret på de anvendte reagenser. Tilsvarende billeder er tilgængelige på vores hjemmeside www.ldbiodiagnostics.com som et eksempel.

Beskrivelse af båndene:

En positiv prøve kan repræsentere flere bånd mellem 8 og 200 kilodaltons (kDa). Nogle er specifikke for leishmaniase. Vanskeligheder med at lokalisere dem mellem de andre bånd uden en bestemt specificitet er imidlertid en gene ved at bruge dem.

Søg efter tilstedeværelsen af 14 og 16 kDa bånd for hver af de testede prøver med de kalibreringsværktøjer, der er beskrevet ovenfor. Disse bånd, som findes foruden på strimlen og generelt godt isolerede, er generelt meget nemme at fortolke.

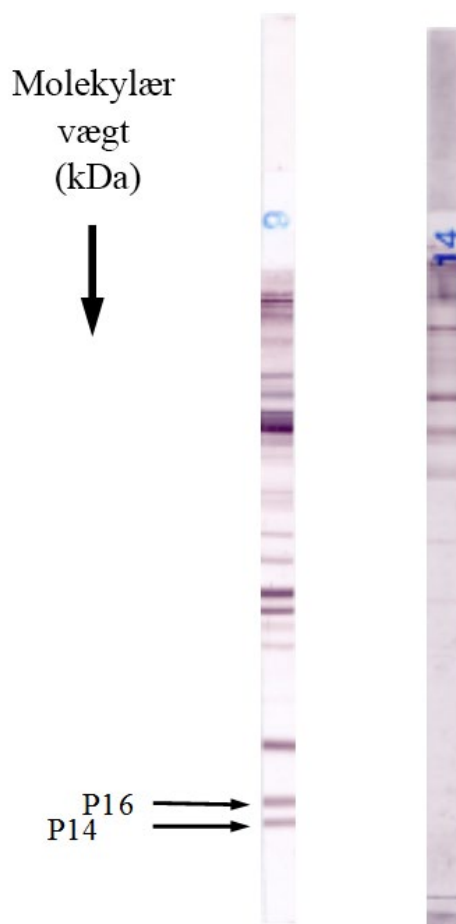


Fig. 1: Eksempler på positive og negative resultater

Profilerne er angivet som eksempler. Strimlerne er markeret med bogstavet "C", der er specifikt for parameteren fra parti "02007".

Fortolkning:

Tilstedeværelsen af 14 kDa og/eller 16 kDa antigenbånd på strimlen gør det muligt at fortolke testen som positiv og at konkludere, at anti-Leishmania IgG-antistoffer er til stede i den testede prøve.

For at validere resultaterne skal profilerne i immunblotten for hver prøve altid sammenlignes med profilen for den positive kontrol R10. Båndenes aspekt er vigtig, når testen skal fortolkes.

Begrænsninger for brug

- Diagnosen af en infektiøs sygdom kan ikke bestemmes på grundlag af et enkelt testresultat.
- Serologiske resultater skal fortolkes i overensstemmelse med tilgængelige oplysninger (f.eks. epidemiologi, kliniske fund, billeddannelse biologi osv.) for at bestemme en diagnose. De bør ikke anvendes som grundlag for en diagnose alene på grundlag af deres positivitet.

Et negativt serologireultat udelukker ikke diagnosen visceral leishmaniasis, især hos immunsupprimerede patienter. Enhver mistanke om leishmaniose skal automatisk udløse en parasitologisk undersøgelse for protozoaner.

Ydeevne (se litteraturhenvisninger)

LEISHMANIA WB IgG-testen blev undersøgt i et komparativt studie med IFA- og ELISA-teknikker på et uafhængigt laboratorium.

Sensitivitet (Se):

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	41	40	51
NEGATIV	10	11	0

Tabel 1: 51 sera fra deltagere med progressiv visceral leishmaniasis blev testet vha. de 3 teknikker. ELISA og IFA frembragte falsk negative resultater, især hos immunsupprimerede patienter (HIV)

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	0	0	15
NEGATIV	20	20	5

Tabel 2: 20 sera fra raske levende patienter i et endemisk område, der havde en positiv hudfølsomhedstest, blev testet parallelt med de tre teknikker: IFA og ELISA er ikke tilstrækkeligt følsomme til at detektere lave niveauer af antistoffer.

Specificitet (Sp):

	IFA	ELISA	WB
POSITIV	0	0	0
NEGATIV	30	30	30

Tabel 3: 30 sera fra raske levende patienter i et ikke-endemisk område blev testet parallelt med immunblotten, ELISA og IFA på et uafhængigt laboratorium: Specificiteten for de tre teknikker var 100 %.

Bemærk: Falske positive reaktioner findes hyppigt uanset teknikken hos patienter med trypanosomiase (T. cruzi).

Konklusion

WB har en fremragende følsomhed, der gør det muligt effektivt at detektere patienter med visceral leishmaniasis selv i en immundepressionsammenhæng.

Det tillader påvisning af asymptomatiske bærere, mens de har en fremragende specificitet, som det fremgår af fraværet af positive sera hos ikke-endemiske patienter.

Se = 100% [IC95 91,3 - 100%]

Sp = 100% [IC95 79,9 - 100%]

Tillidsintervaller beregnes efter Wilsons metode med kontinuitetskorrektion.

Reproducerbarhed

Reproducerbarhed inden for serier og inden for lot blev testet. I begge tilfælde er korrelationen serum til serum fremragende for specifikke bånd.

Interferenser

Selv om der ikke er observeret nogen bestemt krydsreaktion med hæmolyseret, ikterisk eller lipid sera, anbefales det at fortolke resultaterne opnået med brug af sådanne prøver forsigtigt.

Fejlfinding

”Båndene er blege med meget lille kontrast”: Visse sera med lave koncentrationer af antistoffer kan give sådanne resultater.

”Der kan ses nuancerede områder med mere eller mindre farve, lettere diffuse”: Strimlen var ikke helt nedsænket i en af reagenserne og blev ikke inkuberet korrekt langs hele strimlen. Der kan også være pletter, hvor prøven blev anbragt, hvis bakken ikke blev rystet efter anbringelse.

”Baggrundsstøjen er betydelig og gør aflæsning vanskelig”. Vasketrinnene var utilstrækkelige, eller den sidste inkubation var for længe. Sørg for at anvende gode testteknikker, overhold vasketider og sørg for god vandkvalitet. Reducér den sidste inkubationstid. I sjældne tilfælde kan visse sera reagere på en ikke-specifik måde. I så fald kan resultatet af immunblotten ikke anvendes.

Denne ikke-specifikke baggrundsstøj involverer muligvis kun en del af strimlen, og gør det kun umuligt at fortolke resultaterne for den del.

”Et bundfald forekommer i opløsningen i løbet af den sidste udviklingstrin”: Substratet kan delvis udfældes (sorte flager) i bufferen ved slutningen af udviklingen. Dette fænomen ændrer ikke kvaliteten af udviklingen, som skal fortsættes normalt. Den sidste vask med destilleret vand fjerner eventuelle faste partikler, der er til stede.

Bibliografi

- Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marié JL, Terrier O, Levieuge A, et Davoust B. 2009. « Canine Leishmaniasis in South-East of France: Screening of Leishmania Infantum Antibodies (western Blotting, ELISA) and Parasitaemia Levels by PCR Quantification ». *Veterinary Parasitology* 166 (1-2): 27-31. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.006.
- Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuglio A, Romano A, et Ferroglio E. 2010. « Asymptomatic Leishmania Infantum Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Nonendemic ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 131-36. doi:10.1128/JCM.00416-09.
- Cota GF, De Sousa MR, Nogueira Demarqui F, et Rabello A. 2012. « The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.
- Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, et Marty P. 2003. « The Biological Diagnosis of Leishmaniasis in HIV-Infected Patients ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (Supplement-1): 115-33. doi:10.1179/000349803225002598.
- Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, et Trisciuglio A. 2007. « Evaluation of an ELISA Rapid Device for the Serological Diagnosis of Leishmania Infantum Infection in Dog as Compared with Immunofluorescence Assay and Western Blot ». *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 162-66. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.017.
- Kallel K, Ammari L, Kaouech E, Belhadj S, Anane S, Kilani B, et Chaker E. 2007. « [Asymptomatic bearing of Leishmania infantum among Tunisian HIV infected patients] ». *Pathologie-biologie* 55 (10): 521-24. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.017.

- Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, Ravel J, Bastien P, et Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2013. « Surveillance of Leishmaniasis in France, 1999 to 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (29): 20534.
- Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, et Le Fichoux Y. 1994. « Use of the Leishmanin Skin Test and Western Blot Analysis for Epidemiological Studies in Visceral Leishmaniasis Areas: Experience in a Highly Endemic Focus in Alpes-Maritimes (France) ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (6): 658-59.
- Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y, et Kubar J. 1995. « Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to *Leishmania Infantum* ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (6): 690-91.
- Mary C, Lamouroux D, Dunan S, et Quilici M. 1992. « Western Blot Analysis of Antibodies to *Leishmania Infantum* Antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD Antigens for Diagnosis and Epidemiologic Purposes ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (6): 764-71.
- Pomares C, Despierres L, Del Giudice P, Delaunay P, Michel G, Ferrua B, et Marty P. 2012. « Western Blot Analysis as an Aid for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Major* ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (7): 452-54. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.
- Ready P. 2014. « Epidemiology of Visceral Leishmaniasis ». *Clinical Epidemiology*, mai, 147. doi:10.2147/CLEP.S44267.
- Saghrouni F, Khammari I, Kaabia N, Bouguila J, Ben Abdeljelil J, Fathallah A, Amri F, et Ben Saïd M. 2011. « Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia ». *Pathologie-biologie*, décembre. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, et null The LeishVet Group. 2011. « LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis ». *Parasites & Vectors* 4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.
- Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, et Moreno J. 2014. « Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 286-99. doi:10.1111/1469-0691.12556.

Opdateringsmeddelelse - læs omhyggeligt

Udgivelsesdato	Version	Ændringsoversigt
02/08/2021	Vs 15	Fjernelse af sikkerhedsadvarsel R5 - Kontakt e-mail-adresse – NaN3 EUH 032.
24/10/2022	Vs16	R6 uden NaN3. Strimmel identificeret med bogstavet C. Eventuel brug af reagenser fra forskellige batches.
30/11/2022	Vs17	Ny adresse



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com