



Leishmania Canine

IgG - ELISA

Enzyme immunoassay for the qualitative detection of IgG-class antibodies against Leishmania in canine serum
Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Leishmania in Hundeserum

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2	to	6
Deutsch:	Seite	7	bis	11
Bibliography / Literatur	Page / Seite			14
Symbols Key / Symbolschlüssel	Page / Seite			15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung	Page / Seite			16

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Leishmania are protozoa belonging to the family Trypanosomatidae. They are dimorphic obligate intracellular parasites which are transmitted as flagellated forms (promastigotes) by the bite of several species of phlebotomine sandflies. Once inoculated into the skin of the mammalian host, the promastigotes are engulfed by macrophages, in which they transform to amastigotes, an aflagellated form. Inside the macrophages the amastigotes divide and spread to different organs, especially the bone marrow, lymph nodes, skin, spleen, liver, and kidneys.

Leishmania infantum infected dogs constitute the main reservoir of the parasite. Canine visceral leishmaniasis is widespread in countries of the Mediterranean basin, Asia and Latin America. In addition, imported cases of infection are occasionally reported in Northern Europe and North America.

Exposure to bites of infected sandflies can result in an asymptomatic period that may progress to symptomatic infection or remain cryptic. However, both symptomatic and asymptomatic animals harbor the parasite and are infective to sandfly vectors.

Clinical symptoms may appear months to several years after infection. The clinical picture varies widely; symptoms of leishmaniasis include skin lesions (dry exfoliative dermatitis, ulcerations and alopecia), weight loss, local or generalized lymphadenopathy, ocular and periocular lesions, renal failure, epistaxis, lameness, and anemia. Occasionally, some dogs develop chronic diarrhea or liver failure. Polyclonal hyperproteinemia is observed in most dogs. Some animals show leukopenia, whereas others develop leukocytosis. In animals with renal lesions, increased plasma urea and creatinine, proteinuria, and hematuria are common.

2. INTENDED USE

The NovaTec Leishmania Canine IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG-class antibodies against Leishmania in canine serum.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against Leishmania is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with Leishmania antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-dog IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured Leishmania-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine- (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of Leishmania-specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Leishmania Microtiter Strips (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Leishmania antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulfuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Leishmania anti-dog IgG Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled anti-dog IgG, coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Leishmania IgG Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Leishmania IgG Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.
- **Leishmania IgG Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml, coloured yellow, ready to use, green cap.

* contains 0.01 % Kathon after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 2 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at +2...+8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (+20...+25 °C) before starting the test run!

6.1. Microtiter Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Leishmania antigen. Store at +2...+8 °C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at +2...+8 °C; stability until the expiry date.*

6.2. Leishmania anti-dog IgG Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-dog IgG conjugated to horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.3. Controls

The bottles contain a ready to use control solution. They have to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.4. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.5. Washing Solution (20x conc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to +37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at +2...+8 °C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use dog serum samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimens should be kept at +2...+8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.*

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex. *Controls are ready to use and must not be diluted.*

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the Negative Control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the Cut-off Control and
1 well	(e.g. E1)	for the Positive Control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to $+37 \pm 1$ °C.

1. Dispense 100 µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 60 min \pm 5 min at $+37 \pm 1$ °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100 µl Leishmania anti-dog IgG Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value **lower than 0.100**
- **Negative Control** in B1: Absorbance value **lower than 0.200**
- **Cut-off Control** in C1 and D1: Absorbance value between **0.250 and 0.900**
- **Positive Control** in E1: Absorbance value higher than Cut-off

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off value is calculated as the mean value of the determined Cut-off controls in C1 and D1.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.39 + absorbance value Cut-off Control 0.37 = $0.76 / 2 = 0.38$

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 20 % over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 20 % above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative
→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 20 % below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example:
$$\frac{1.786 \times 10}{0.43} = 42 \text{ NTU (NovaTec Units)}$$

Cut-off:	10	NTU
Grey zone:	8-12	NTU
Negative:	<8	NTU
Positive:	>12	NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	4	1.54	7.1

Intraassay	n	Mean	Cv (%)
Pos. Serum	11	1.6	6.1

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.
It is > 95 %.

10.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.
It is 95 %.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after the expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaTec ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: LEIG0310V Leishmania Canine IgG-ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Protozoen der Gattung *Leishmania* sind dimorphe obligat intrazelluläre Parasiten. Übertragen werden sie als begeißelte Formen (Promastigoten) durch den Stich verschiedener Sandmückenarten (Phlebotominae). Einmal in die Haut des Säugerwirts eingebracht, werden die Promastigoten durch Makrophagen aufgenommen und wandeln sich dort in Amastigoten, unbegeißelte Formen, um. Innerhalb der Makrophagen teilen sich die Amastigoten und breiten sich in verschiedene Organe aus, insbesondere in Knochenmark, Lymphknoten, Haut, Milz, Leber und Nieren.

Leishmania infantum infizierte Hunde stellen das Hauptreservoir des Parasiten dar. Die canine viszerale Leishmaniose ist in den Ländern des Mittelmeerraums, Asien und Lateinamerika weit verbreitet. Darüber hinaus treten importierte Leishmaniosen gelegentlich auch in Nordeuropa und Nordamerika auf.

Nicht jeder infizierte Hund erkrankt an Leishmaniose. Ob und wann klinische Symptome auftreten, ist unter anderem vom Immunstatus des Tieres abhängig. Allerdings tragen auch Hunde, die keine Symptome zeigen, den Parasiten in sich und sind für Sandmücken-Vektoren infektiös.

Klinische Symptome können einige Monate oder sogar Jahre nach Infektion auftreten. Das Krankheitsbild ist sehr vielfältig und umfasst Hautläsionen (trockene exfoliative Dermatitis, Ulzerationen und Alopezie), Gewichtsverlust, lokale oder generalisierte Lymphadenopathie, Veränderungen an Augen und Lidern, Nierenversagen, Epistaxis, Lahmheiten und Anämie. Einige Hunde entwickeln chronische Diarrhöe oder Leberversagen. Eine polyklonale Hyperproteinämie wird bei den meisten Hunden beobachtet. Einige Tiere zeigen Leukopenie, während andere eine Leukozytose entwickeln. Bei Tieren mit Nierenschädigung können Harnstoff und Kreatinin erhöht sein, Proteinurie und Hämaturie sind häufig.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec *Leishmania canine* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Leishmania infantum* in caninem Serum bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern gegen *Leishmania infantum* beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit *Leishmania infantum* spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-canine IgG Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstanden Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) -Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Leishmania infantum beschichtete Mikrotiterstreifen:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *Leishmania infantum* Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Leishmania anti-canine IgG Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen Hunde IgG; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Leishmania infantum Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Leishmania infantum Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Leishmania infantum Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.01 % Kathon nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei +2...+8 °C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (+20...+25 °C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem Leishmania Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei +2...+8 °C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei +2...+8 °C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. Leishmania anti-canine IgG Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-canine IgG-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei +2...+8 °C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.4. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf +37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht bläulich. Sollte die TMB-Substratlösung nach blau umschlagen, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten Hunde-Serumproben verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei +2...+8 °C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex). *Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.*

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle,
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $+37 \pm 1$ °C einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei +37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

5. 100 µl Leishmania anti-canine IgG Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (+20...+25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (+20...+25 °C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1+1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1+100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in OD wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

*Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.*

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion **niedriger als 0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion **niedriger als 0,200**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionwerte zwischen **0,250 und 0,900**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionwerte größer als der Cut-off

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0.37 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0.39 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0.76 : 2 = \underline{0.38}$

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 20 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 20 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 20 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	8-12	NTU
Negativ:	<8	NTU
Positiv:	>12	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	4	1.54	7.1

Intraassay	n	Mittelwert	Vk (%)
Pos. Serum	11	1.6	6.1

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist > 95 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 95 %.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaTec ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN






Produktnummer: LEIG0310V Leishmania canine IgG-ELISA (96 Bestimmungen)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Ashford, D.a., Baduro, R. Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalia, M.G. and David, J.R. 1993. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA a) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Med. Hyg.* 48(1):1-8.

Neogy, A.B., Vouldoukis, A.S., Otamires, Y., Tselentis, J.C., Lascombe, T., Segalen, D. Rzepka, D. and Monour, L. 1993. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: Applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 47:772-777.

Evans, T.G., Vasconcelos, I.A.B., Lima, J.N., Teixeira, J.M., McAullife, I.T., Lopes, U.G., Pearson, R.D., Vasconcelos, A.W. 1990. Canine visceral leishmaniasis in northeast brazil: assessment of serodiagnosis methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42: 1118-123.

Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
[REF]	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaque / Micropiastra / Microplaca
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative / Kontrollserum, negative / Sérum de contrôle négatif / siero di controllo, negativo / Suero control negativo / Soro de controle negativo
CONTROL +	Control serum, positive / Kontrollserum, positiv / Sérum de contrôle positif / siero di controllo, positivo / Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum / Cut off Kontrollserum / Sérum de contrôle du cut-off / siero di controllo, cut-off / Suero control Cut-off
DIL G	Sample diluent buffer IgG / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon diluant pour échantillon IgG / soluzione tampone per i campioni IgG / solución tampón para muestras IgG
SOLN STOP	Stop solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Substrat TMB / soluzione substrato TMB / solución substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated / Waschlösung 20x konzentriert / Solution de lavage concentré 20 x / soluzione di lavaggio concentrazione x20 / solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Leishmania Canine IgG-ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative Control	Positive Control	Cut-off Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100µl	-	-	-
Positive Control	-	-	100µl	-	-
Cut-off Control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
 D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
 Email: info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

LEIG0310V-canine-dt,engl-26082008-EH