

## **RIDASCREEN® Leishmania Ab**

Enzymimmunoassay zum Nachweis von  
Antikörpern gegen Leishmania spec.

Enzyme immunoassay for the detection of  
antibodies against Leishmania spec.

Art. No.: K 7121 (96 Tests)  
K 7122 (48 Tests)

In vitro Test  
Lagerung bei 2 - 8 °C  
Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany  
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:  
 R-Biopharm AG  
 Dolivostr. 10  
 D-64293 Darmstadt  
 www.r-biopharm.de

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:  
 Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0  
 Sekretariat Marketing (0 61 51) 81 02-23

Telefax / E-Mail:  
 Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20  
 orders@r-biopharm.de  
 Marketing (0 61 51) 81 02-40  
 info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®  
 sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG  
 Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

RIDA® and RIDASCREEN®  
 are registered trademarks of R-Biopharm AG  
 Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeines.....	4
2. Einleitung.....	4
3. Testprinzip.....	5
4. Packungsinhalt.....	6
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör.....	6
6. Vorsichtsmaßnahmen.....	7
7. Reagenzien und ihre Lagerung.....	7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall.....	8
9. Sammlung und Lagerung der Proben.....	8
10. Testdurchführung.....	8
11. Auswertung.....	10
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation.....	11

## Contents

	page
1. Intended use.....	13
2. General.....	13
3. Test principle.....	14
4. Reagents provided.....	15
5. Materials required but not provided.....	15
6. Warnings and precautions for the users.....	16
7. Storage instructions.....	16
8. Indication of instability or deterioration of reagents.....	17
9. Specimen collection and storage.....	17
10. Test procedure.....	17
11. Analysis.....	19
12. Remarks about the test procedure and interpretation.....	20

## Appendix

Literature.....	21
-----------------	----

## 1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Leishmania Ab-Test ist ein Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen Leishmania (Spezies: donovani, major, mexicana, braziliensis) in humanem Serum.

## 2. Einleitung

Die Leishmaniose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Flagellaten der Gattung Leishmania verursacht wird. Es sind drei klinische Manifestationen bekannt, die durch unterschiedliche Spezies ausgelöst werden.

- a) Viszerale Leishmaniose oder Kala-Azar: Die viszerale Form wird durch Leishmania donovani (Indien, Afrika), L. infantum (Mittelmeerraum, Asien, Mittlerer Osten) und L. chagasi (Südamerika) verursacht. Die Parasiten vermehren sich intensiv im retikuloendothelialen System von Milz, Leber, Lymphknoten, Rückenmark, Darmschleimhaut und anderen Organen. Hierdurch kommt es zu einer Vergrößerung dieser Organe. Die Inkubationszeit beträgt einen bis vier Monate. Das anfängliche Fieber ist intermittierend und kann bis auf 40 °C steigen. Es entwickelt sich eine deutliche Leukopenie mit relativer Monozytose und Lymphozytose, Anämie und Thrombozytopenie, wodurch der Patient für Sekundärinfektionen besonders anfällig wird. Unbehandelt verläuft die Erkrankung meist innerhalb von zwei Jahren tödlich, wobei es bei einem fulminanten Verlauf auch innerhalb von wenigen Wochen zum Tode kommen kann.
- b) Kutane Leishmaniose: Diese Form der Erkrankung wird durch L. major oder L. tropica (Alte Welt) und durch L. mexicana und L. braziliensis (Amerika) ausgelöst. Die Erkrankung wird in den verschiedenen Ländern meist unterschiedlich benannt. Beim Menschen bleibt die Infektion auf die Haut begrenzt und führt zur Bildung von geschwürig zerfallenden Papeln. Die Inkubationszeit liegt zwischen zwei Wochen und mehreren Monaten. Die kutane Leishmaniose stellt die mildeste Form der Erkrankung dar.
- c) Amerikanische oder Schleimhautleishmaniose: Zumeist wird diese Form durch L. braziliensis hervorgerufen, kann aber auch durch andere Spezies verursacht werden. Das klinische Bild und die histopathologischen Befunde der amerikanischen Leishmaniose unterscheiden sich zunächst nicht von der kutanen Form. Im Laufe der Erkrankung kommt es dann aber zum Befall der Schleimhäute. Dieser führt zu schmerzhaften Läsionen und kann schwere Mißbildungen durch Erosion des nasalen Septums, des Gaumens oder des Larynx auslösen.

Der Entwicklungszyklus von Leishmania schließt einen Wirtswechsel zwischen einem Insekt und einem Vertebraten ein. Neben dem Menschen sind als natürliche Wirte unter den Vertebraten hauptsächlich Nagetiere und Karnivoren zu fin-

den. Die Übertragung erfolgt durch Sandfliegen der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia (Amerika). Werden während des Blutsaugens infizierte Makrophagen von den Sandfliegen aufgenommen, wandeln sich in den Insekten die Leishmanien von der amastigoten (ohne Flagellen) zur promastigoten Form (mit Flagellen). Innerhalb von 8 – 20 Tagen vermehren sich die Flagellaten im Darm des Insekts, wandern anschließend in den Stechrüssel und werden bei nachfolgenden Saugakten übertragen. Eine Übertragung kann aber auch bereits durch eine oberflächliche Kontamination kleiner Wunden erfolgen.

Die Leishmaniose kommt hauptsächlich im Bereich der Tropen und Subtropen vor hat aber aufgrund importierter Infektionen eine weltweite Bedeutung. Die Inzidenz der Erkrankung nimmt zu. Weltweit sind etwa 350 Mio. Menschen von einer Infektion bedroht. Somit gehört die Leishmaniose zu den sechs wichtigsten Infektionserkrankungen.

## 3. Testprinzip

An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind inaktivierte, lösliche Antigene von Leishmania gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen und der Kalibrator pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an die immobilisierten Antigene. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.

Danach erfolgt die Zugabe eines Anti-human-Ig-Konjugates (Peroxidase-markierter IgG-Antikörper), das an zuvor gebundene Antikörper bindet. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Substrat und Chromogen, das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (optional: Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm).

## 4. Packungsinhalt

### 4.1. Testkit für 96 Bestimmungen (Art. No. K 7121)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.  
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;  
beschichtet mit inaktiviertem Leishmania Antigen;  
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x Probenpuffer (50 ml, pH 7,4); gebrauchsfertig, gelb gefärbt, farbloser Deckel
- 1 x Waschpuffer (50 ml, pH 7,4); 20fach konz., blau gefärbt, brauner Deckel
- 1 x Kalibrator (1,2 ml), grüner Schraubverschluss;  
inaktiviertes Humanserum, gebrauchsfertig
- 1 x Positivkontrolle (1,2 ml), roter Schraubverschluss;  
inaktiviertes Humanserum, gebrauchsfertig
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml), farbloser Schraubverschluss;  
inaktiviertes Humanserum, gebrauchsfertig
- 1 x Anti-human-Ig-Konjugat (12 ml), roter Deckel;  
Peroxidase-markierter IgG-Antikörper (Ziege), gebrauchsfertig
- 1 x Substrat (6 ml), grüner Deckel;  
Harnstoffperoxid, gebrauchsfertig
- 1 x Chromogen (6 ml), blauer Deckel;  
Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x Stopp-Reagenz (6 ml), gelber Deckel;  
1 M Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

### 4.2. Testkit für 48 Bestimmungen (Art. No. K 7122)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 48 Bestimmungen.  
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 6 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen (teilbar) im Halterahmen;  
beschichtet mit inaktiviertem Leishmania Antigen;  
in verschließbarem Alu-Beutel

Die anderen Kitbestandteile sind identisch mit Art. No. K 7121 (siehe Pkt. 4.1.).

## 5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

### 5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

## 5.2. Zubehör

- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 - 100 µl und 100 - 1000 µl Volumina
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, evtl. Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

## 6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Positiv- und Negativkontrolle) und der Kalibrator wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HBsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Harnstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 M Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch von Reagenzien zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

## 7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen lang haltbar.

Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluss nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 - 8 °C zu lagern.

Eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Chromogen ist zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Chromogen nicht mehr verwendet werden.

## 8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Chromogens vor Zugabe in die Kavitäten
- ein Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450 nm > 0,3
- ein Extinktionswert der Positivkontrolle bei 450 nm < 0,6

## 9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® Leishmania Ab EIA ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.

Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 - 8 °C haltbar.

## 10. Testdurchführung

### 10.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab.

Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschrritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschrritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.

Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.

Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

### 10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Waschpuffer-Konzentrates wird mit 19 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen.

50 ml des Konzentrates werden in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 - 8 °C vier Wochen lang haltbar.

### 10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer 1:20 verdünnt.

z. B. 10 µl Serum + 190 µl Probenpuffer

### **Achtung!**

**Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.**

### 10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den Kontrollen, dem Kalibrator und den verdünnten Seren jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird empfohlen den Kalibrator in Doppelbestimmung mitzuführen.

### 10.5. Waschen

Die Kavitäten werden in einen Behälter mit einem Desinfektionsmittel entleert. Um die Restfeuchtigkeit zu entfernen, sollte die Platte auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden. Anschließend wird 5mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

**Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.**

### 10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl (oder 2 Tropfen) des Anti-human-Ig-Konjugates in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

### 10.7. Waschen

5maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

### 10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von je 50 µl (oder 1 Tropfen) Substrat und Chromogen in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 50 µl (oder 1 Tropfen) Stopp-Reagenz

in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion bei 450 nm gemessen (evtl. Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen Luft.

**Achtung:**  
**Hoch positive Proben können zu einem dunklen Präzipitat des Chromogens führen.**

### Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des Waschpuffers
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 100  $\mu$ l Positivkontrolle, Kalibrator (Doppelbestimmung), Negativkontrolle bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5maliges Waschen mit 300  $\mu$ l Waschpuffer
6. Zugabe von 100  $\mu$ l (oder 2 Tropfen) Anti-human-Ig-Konjugat; 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 5maliges Waschen mit 300  $\mu$ l Waschpuffer
8. Zugabe von je 50  $\mu$ l (oder 1 Tropfen) Substrat und Chromogen; 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
9. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l (oder 1 Tropfen) Stopp-Reagenz photometrische Auswertung bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge  $\geq 620$  nm)

## 11. Auswertung

### 11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Positivkontrolle, Kalibrator (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mitzuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionswert (O.D.) der Positivkontrolle bei 450 nm größer 0,6 ist. Das Verhältnis aus Extinktionswert der Positivkontrolle und des Kalibrators muß größer 1,5 sein. Der Extinktionswert der Negativkontrolle muß kleiner 0,3 sein. Zusätzlich muß der Extinktionswert der Negativkontrolle kleiner als der des Kalibrators sein.

### 11.2. Berechnung des Proben-Index

- a) Der Extinktionsmittelwert des Kalibrators wird berechnet. Dieser Wert ist der cut-off des Tests.
- b) Durch Division des Extinktionswertes der Probe durch den cut-off erhält man den Proben-Index.

z. B.: Kalibrator Messung 1 O.D. = 0,541  
 Kalibrator Messung 2 O.D. = 0,554  
 Probe O.D. = 1,441

cut-off = **Fehler!** = 0,548

Proben-Index = **Fehler!** = 2,63

### 11.3. Testergebnis

Tab. 1: Bewertung des Proben-Index

	negativ	grenzwertig	schwach positiv	mittel positiv	hoch positiv
Proben-Index	< 0,9	0,9 - 1,1	1,1 - 1,5	1,5 - 2,5	> 2,5

## 12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® Leishmania Ab EIA weist spezifisch Antikörper gegen Leishmania (Spezies: donovani, major, mexicana, braziliensis) 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.

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.

## RIDASCREEN® Leishmania Ab

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies against Leishmania spec.

### 1. Intended use

The RIDASCREEN® Leishmania Ab test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of specific antibodies against Leishmania (species: donovani, major, mexicana, braziliensis) in human serum.

### 2. General

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by different species of a flagellate protozoa genus Leishmania. The most characteristic clinical forms of the disease are:

- Visceral leishmaniasis or kala-azar: produced by *L. donovani* (India, Africa), *L. infantum* (Mediterranean zone, Asia, Middle East) and *L. chagasi* (South America). The phagocytosed parasites are numerous in the reticuloendothelial (RE) cells of the spleen, liver, lymph nodes, bone marrow, intestinal mucosa and other organs. These organs tend to enlarge due to the enormous growth of the RE cells. Incubation periods last 1 to 4 months. The initial fever is intermittent and rise to 40 °C. A marked leucopenia with relative monocytosis and lymphocytosis, anemia and thrombocytopenia develop, rendering the patient especially susceptible to secondary infections. Untreated disease usually progresses to a fatal termination within 2 years, although fulminating infections may cause death within few weeks.
- Cutaneous leishmaniasis: Produced by *L. major* or *tropica* (Old World) and by *L. mexicana* and *braziliensis* (America). The disease is known with different names in each country. In humans the disease is limited to the cutaneous tissues. Incubation periods last from 2 weeks to several months. It is the least severe form of the disease.

- c) American or mucocutaneous leishmaniasis: Mainly produced by *L. braziliensis*, although other species produced similar mucocutaneous lesions. The clinical appearance and histopathology of american leishmaniasis are identical to cutaneous leishmaniasis, except that it may produce later mucous membrane involvement. The mucosal lesions are painful and can cause great deformity with erosion of the nasal septum, palate, or larynx.

The life cycle involves an alternate existence in a vertebrate and an insect host. The natural host, besides humans, are rodents and carnivores. The invertebrate hosts are sandflies of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia* (America). After parasites within infected cells are ingested with the blood meal, they transform within the insects from the amastigote (without flagella) to the promastigote form (with flagella) and multiply in the gut. In 8 to 20 days, the anterior gut and pharynx are partially blocked by flagellates. When the sandfly attempts a subsequent blood meal, some of the infective promastigotes are dislodged and introduced into the skin. Transmission can also occur by contamination of wounds.

Leishmaniasis has a world wide distribution, mainly in tropic and subtropic zones. The incidence of the disease is rising and infection is calculated to threaten 350 million people. It is one of the six most important infectious diseases in the world.

### 3. Test principle

On the surface of the microtiter wells, inactivated soluble antigens of *Leishmania* are bound. Diluted serum samples, controls and calibrator are pipetted into the wells and incubated at room temperature. Present antibodies bind to the immobilized antigens. Unbound material is removed in a washing step.

In a second step, an anti-human Ig-conjugate (peroxidase-conjugated IgG antibody) is added, which binds to the antibodies bound before. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (urea peroxide) and chromogen (TMB) are added to the wells and incubated at room temperature. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate/chromogen to a blue color. Addition of stop solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (optional: reference wavelength  $\geq 620$  nm).

## 4. Reagents provided

### 4.1. Test kit for 96 determinations (Art. No. K 7121)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations. Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame; coated with inactivated *Leishmania* antigen; in a resealable foil bag
- 1 x Sample Buffer (50 ml, pH 7.4), ready to use, dyed yellow, colorless lid
- 1 x Washing Buffer (50 ml, pH 7.4), 20x conc., dyed blue, brown lid
- 1 x Calibrator (1.2 ml), green screw cap; inactivated human serum, ready to use
- 1 x Positive Control (1.2 ml), red screw cap; inactivated human serum, ready to use
- 1 x Negative Control (1.2 ml), colorless screw cap; inactivated human serum, ready to use
- 1 x Anti-human Ig-Conjugate (12 ml), red cap; HRP-conjugated IgG-antibody (goat), ready to use
- 1 x Substrate (6 ml), green cap; urea peroxide, ready to use
- 1 x Chromogen (6 ml), blue cap; tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x Stop Solution (6 ml), yellow cap; 1 M sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

### 4.2. Test kit for 48 determinations (Art. No. K 7122)

The reagents in one package are sufficient for 48 determinations. Each test kit contains:

- 1 x 6 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame; coated with inactivated *Leishmania* antigen; in a resealable foil bag

Other kit components are identical to Art. No. K 7121 (see point 4.1.).

## 5. Reagents required but not provided

### 5.1 Reagents

- Distilled or deionized water

## 5.2 Accessories

- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, optional: reference wavelength  $\geq$  620 nm)
- Absorbent paper

## 6. Warnings and precautions for the users

The control sera and the calibrator have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The stop solution contains 1 M sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of reagents between kits of different lot numbers is not possible.

## 7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.

The diluted washing buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 - 8 °C.

Allow reagents and microwell strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.

The colorless chromogen must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autoxidation. If the chromogen has turned blue, the reagent should be discarded.

## 8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless chromogen prior to its use
- an absorbance value (O.D.) of the negative control at 450 nm  $>$  0.3
- an absorbance value (O.D.) of the positive control at 450 nm  $<$  0.6

## 9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® Leishmania Ab EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.

The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.

If they have been stored at 2 - 8 °C, diluted samples can be used for up to 7 hours.

## 10. Test procedure

### 10.1. Preliminary comments

Bring all reagents and the microwell strips for at least 30 minutes to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences.

During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps.

Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.

Except the washing buffer, all reagents are ready to use.

### 10.2. Preparation of the washing buffer

1 part of the concentrated washing buffer is diluted with 19 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C.

Add 50 ml of the concentrated washing buffer to a 1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted washing buffer has a shelf life of 4 weeks if stored at 2 - 8 °C.

### 10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted 1:20 with the sample buffer.

e.g. 10 µl serum + 190 µl sample buffer

#### **Attention!**

**The controls included in the kit are ready to use and must not be diluted.**

### 10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 100 µl of the positive control, the calibrator, the negative control and the diluted sera are pipetted into the wells and incubated for 10 min at room temperature. It is recommended to use the calibrator in double determination in each run.

### 10.5. Washing

Decant or aspirate all microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 5 times with 300 µl of prepared washing buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after single washing steps.

**If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.**

### 10.6. Second incubation

Add 100 µl or 2 drops of anti-human Ig-conjugate to all wells. Incubate the plate for 5 min at room temperature.

### 10.7. Washing

Wash 5 times according to step 10.5.

### 10.8. Third incubation

Add 50 µl or 1 drop of substrate and 50 µl or 1 drop of chromogen into each well. Incubate the plate for 10 min at room temperature in the dark. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 50 µl or 1 drop of stop solution to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (optional: reference wavelength  $\geq$  620 nm).

#### **Remark:**

**Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen.**

#### **Summary of the test procedure**

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the washing buffer
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 100 µl of the positive control, the calibrator (double determination), the negative control and the diluted samples into the microwells; 10 minutes incubation at room temperature
5. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of washing buffer
6. Add 100 µl or 2 drops of anti-human Ig- conjugate; 5 minutes incubation at room temperature
7. Discard the incubate and wash 5 times with 300 µl of washing buffer
8. Add 50 µl or 1 drop each of substrate and chromogen; 10 min incubation at room temperature in the dark
9. After addition of 50 µl or 1 drop stop solution spectrophotometric determination at 450 nm (optional: reference wavelength  $\geq$  620 nm)

## **11. Analysis**

### 11.1. Quality control

For the quality control, positive control, calibrator (double determination) and negative control must be carried along with each test run. The test was carried out correctly, if the positive control shows an absorbance value (O.D.) at 450 nm greater than 0.6. The ratio between the O.D. of the positive control and the O.D. of the calibrator must be greater than 1.5. The absorbance value of the negative control at 450 nm must show a value lower than 0.3. Additionally, the O.D. of the negative control must be less than the O.D. of the calibrator.

### 11.2. Calculation of the sample ratio

- a) Calculate the average O.D. of the calibrator. This value is the cut-off value of the assay.
- b) Divide the sample O.D. by the value obtained in point a).

e.g.: calibrator well 1            O.D. = 0.541  
         calibrator well 2        O.D. = 0.554  
         sample                    O.D. = 1.441

cut-off value = Fehler!= 0.548

sample ratio = Fehler!= 2.63

### 11.3. Test result

Tab. 1: Valuation of sample ratio

	negative	equivocal	low positive	middle positive	high positive
sample ratio	< 0.9	0.9 - 1.1	1.1 - 1.5	1.5 - 2.5	> 2.5

### 12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN® Leishmania Ab EIA detects specifically antibodies against Leishmania (species: donovani, major, mexicana, braziliensis). It should be used in suspected cases of Leishmaniasis. Assay results should always be interpreted in connection to the clinical diagnosis and other diagnostic results.

Equivocal and low positive results can happen in these cases:

- Persons that were bitten by infected Phlebotomus at endemic areas and did not develop the disease but have a low antibody level.
- Persons that presently have or suffered from asymptomatic disease, so they still have a low antibody level.
- Persons that suffered from the disease in the past and still have a low antibody level.
- Persons that are developing the disease.
- Unidentified and unspecific reaction factors.

These cases should be further investigated, retesting a fresh new sample and including clinical symptoms and additional tests. In case the same result is obtained, the test must be repeated with a new sample after 2-4 weeks.

Middle and high positive results can happen in persons that are suffering from the disease or have suffered a recent infection, or with past infections that still have a high antibody level. It is necessary to compare these results with clinical symptoms and additional tests.

Negative antibody findings cannot exclude a leishmaniasis. Due to low antibody titer at early time of an infection, the test can show negative results. If a clinical suspicion subsists, after two to four weeks another patient's sample should be tested.

It has been founded that in South America, this test may cross react in some occasions with serum positive to T.cruzi (or Chagas disease). Therefore, special caution must be taken in areas of South America where Chagas disease is present, when using this test.

## Appendix

### Literature

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).