

Gebrauchsinformation

LEISHMANIA-ELISA DOG

Test zum Nachweis von Antikörpern
gegen den Erreger Leishmaniose beim Hund,
Leishmania infantum

Nur für den tierärztlichen Gebrauch

- Schnelle und einfache Testdurchführung
- Gebrauchsfertige Reagenzien
- Für Einzelerenuntersuchungen geeignet



REF

1 Platte (Katalog-Nr. LED-Kit)

REF

5 Platten (Katalog-Nr. LED-Kit5)

LOT

Chargenbezeichnung siehe Etikett



Verwendbar bis siehe Etikett



96



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b
04103 Leipzig, Deutschland

Ordering: www.indical.com/contact
Technical Support: support@indical.com
Website: www.indical.com

INDICAL
BIOSCIENCE

Inhalt

Bestandteile des Kits	3
Produktbeschreibung	4
Allgemeine Informationen	4
Beschreibung des Testprinzips.....	5
Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien	6
Art der Anwendung	7
Verwendung der Mikrotiterplatten.....	7
Vorbereitung der Testreagenzien	8
Probenvorbereitung	9
Durchführung des Tests	10
Auswertung	12
Richtwerte zur Überprüfung der korrekten Testdurchführung	12
Berechnung der Testergebnisse	13
Bewertung der Testergebnisse.....	13
Interpretation der Testergebnisse.....	14
Art der Aufbewahrung	14
Vorsichtsmaßnahmen und allgemeine Warnhinweise	15
Haftung	17
Symbole	18
Änderungsindex.....	18

Bestandteile des Kits

LEISHMANIA-ELISA DOG		
Katalog-Nr.	LED-Kit	LED-Kit5
Testplatte: Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten, beschichtet mit <i>Leishmania</i> - Antigen (inaktiviert), 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, einzeln abbrechbar	1	5
Probenverdünnungspuffer: Puffer mit Proteinzusatz, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig	1 x 50 ml weißer Deckel	2 x 125 ml transparenter Deckel
Waschpuffer (10x): phosphatgepuffert, 10fach konzentriert, konserviert mit ProClin 300	2 x 50 ml weißer Deckel	2 x 125 ml transparenter Deckel
Konjugatlösung: Anti-Hund-IgG-Antikörper, mit Meerrettichperoxidase konjugiert, konserviert mit ProClin 300, gebrauchsfertig	1 x 12 ml roter Deckel	2 x 60 ml brauner Deckel
Substratlösung: Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, gebrauchsfertig	1 x 12 ml blauer Deckel	2 x 60 ml brauner Deckel mit weißem Punkt
Stopplösung: 1 N Schwefelsäure, gebrauchsfertig, Vorsicht ätzend	1 x 12 ml gelber Deckel	1 x 60 ml transparenter Deckel mit gelbem Punkt
Positiv-Kontrollserum: von mit <i>Leishmania</i> - Erregern experimentell infizierten Hunden gewonnener Serumpool, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig	1 x 1,5 ml roter Deckel	2 x 2,5 ml roter Deckel
Negativ-Kontrollserum: von <i>Leishmania</i> - Erregern frei aufgezogenen Hunden gewonnenes Serum, konserviert mit Natriumazid, gebrauchsfertig	1 x 1,5 ml grüner Deckel	2 x 2,5 ml blauer Deckel
Gebrauchsinformation	1	1

Produktbeschreibung

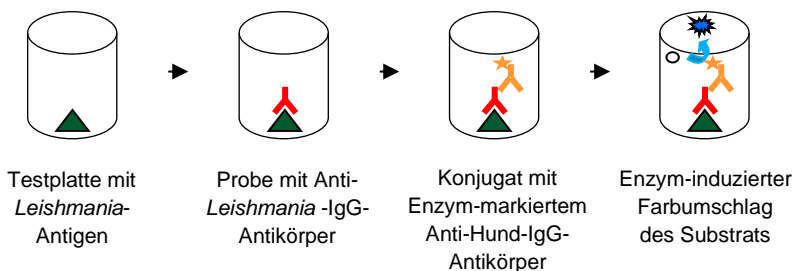
Der LEISHMANIA-ELISA DOG ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) in Mikrotiterplattenformat zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Leishmania infantum*, dem Erreger der Leishmaniose, in Blutserum- oder Blutplasmaproben von Hunden.

Allgemeine Informationen

Die Leishmaniose ist eine in den Tropen, Subtropen und in Südeuropa sowie im Mittelmeerraum bis zum 45. Breitengrad verbreitete Zoonose wobei Hunde als Reservoirwirte Infektionsraten zwischen <1 % bis zu 37% aufweisen. Die Leishmaniose des Hundes (Erreger ist *Leishmania infantum*) hat auch in weiter nördlich liegenden Regionen als Reise- oder Importerkrankung beachtenswerte Bedeutung. Die Erreger werden durch Schmetterlingsmücken (Phlebotomen) übertragen. Bei einer Inkubationszeit von Monaten bis Jahren können Hunde aller Altersstufen erkranken. Die Erkrankung kann symptomatisch (mit polyklonaler B-Zell- Aktivierung, Bildung spezifischer Antikörper und unterdrückter zellulärer Immunreaktion), subklinisch (mit spezifischer humoraler Immunantwort) oder latent (ohne oder mit nur schwacher humoraler und protektiver zellulärer Immunantwort) verlaufen. Klinische Symptome sind in abnehmender Häufigkeit, Lymphadenopathie, Hautveränderungen, Kachexie, Hyperthermie, Konjunktivitis, Milzvergrößerung und abnorme Krallen. Oft werden leicht- bis mittelgradige normochrome Anaemie, mäßige Leukopenie, Hypergammaglobulinämie und Hypoalbuminämie beobachtet. Die Verdachtsdiagnose basiert auf klinischen, hämatologischen und anamnestischen Daten und kann - außer bei latenten Infektionen ohne humorale Immunantwort - in den meisten Fällen durch den Nachweis spezifischer anti-*Leishmania*-Antikörper mit vorliegendem Test bestätigt werden.

Beschreibung des Testprinzips

Das Testsystem dient zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Leishmania infantum* in Blutserum- oder Blutplasma von Hunden. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer *Leishmania*-Antigen-Präparation beschichtet. Antikörper gegen *Leishmania infantum* bilden während der Inkubation der Probe in der beschichteten Vertiefung einen Komplex mit dem Antigen. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Das hinzugefügte Enzym-Konjugat bindet sich an die antigengebundenen IgG-Antikörper. Ungebundenes Enzym-Konjugat wird herausgewaschen. Nach Hinzugabe der Substratlösung erfolgt eine Farbentwicklung durch antikörpergebundenes Enzym. Die Farbreaktion steht in Korrelation zur Menge von Anti-*Leishmania*-Antikörpern in der Probe. Die diagnostische Bewertung erfolgt durch den Vergleich der Extinktionswerte von Proben und Kontrollen.



Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien

(Nicht im Lieferumfang enthalten)

- Behälter für Herstellung von 1x Waschpuffer
- Destilliertes- bzw. Reinstwasser
- Präzisionspipetten
- Einwegpipettenspitzen
- Einmal-Gefäße für die Verdünnung der Proben
- Pipettierreservoirs
- Saugfähige Unterlage wie z. B. Papierhandtücher (zum Ausschlagen der Platte/ der Strips nach den Waschvorgängen empfohlen)
- ggf. Leerrahmen für benötigte Anzahl der Mikrotiterstreifen
- Abdeckplatten oder -folie für die Mikrotiterplatte
- Gefäße für benötigte Teilmenge der Konjugatlösung und Substratlösung
- Vortex-Mixer
- Stoppuhr
- Waschautomat für Mikrotiterplatten oder Mehrkanal-Pipette (300 µl)
- Photometer für Mikrotiterplatten Filter 450 nm

Art der Anwendung

Verwendung der Mikrotiterplatten

Mit einer Mikrotiterplatte können maximal 91 Proben untersucht werden.

Die Mikrotiterplatte wird in einem Folienbeutel mit Wiederverschluss geliefert. In der Verpackung befindet sich außerdem ein Trockenbeutel mit Indikator.

Die Mikrotiterplatte besteht aus 12 Streifen mit je 8 Reaktionsvertiefungen. Es sollten nur so viele Streifen/Wells entnommen und in einem separaten gut verschlossenen Beutel auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) gebracht werden, wie für die Untersuchung der entsprechenden Anzahl der Proben notwendig sind (z.B. für 10 Proben 2 Streifen). Die nicht benötigten Streifen sollten ständig bei 2 bis 8°C lagern und keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden.

Es ist unbedingt darauf zu achten, dass der Folienbeutel nach jedem Öffnen wieder ordnungsgemäß verschlossen wird. Dabei ist die Funktionalität des Verschlusses zu überprüfen. Ein Farbumschlag des Trockenbeutel-Inhalts von blau nach hellrot deutet auf eine hohe relative Luftfeuchte im Folienbeutel hin; der Trockenbeutel ist bei Bedarf zu erneuern.

Einmal verwendete Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden!

Vorbereitung der Testreagenzien

Die benötigten Testreagenzien sind vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) zu bringen und vor der Verwendung durch Schwenken der Flasche bzw. Vortexen des Plastikröhrchens gründlich zu durchmischen.

Aus dem Behältnis mit der Konjugatlösung und Substratlösung entnehmen Sie die benötigte Menge, überführen sie in ein separates Gefäß und bringen diese auf Raumtemperatur. Nicht benötigte Konjugatlösung bzw. Substratlösung soll ständig bei 2 bis 8°C lagern und darf keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden.

Substrat- und Konjugatlösung dürfen starken Lichteinfall nicht ausgesetzt werden. Nach längerer Kühlung kann sich die Substratlösung durch spontane Umsetzung schwach bläulich färben. Diese leichte Färbung verschwindet nach Erwärmung auf Raumtemperatur.

Stellen Sie die benötigte Menge an Waschpuffer her, indem Sie die entsprechende Menge des 10-fach Konzentrats 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen (1 Teil Konzentrat + 9 Teile Wasser). Sollten sich Kristalle im Waschpufferkonzentrat befinden, so lösen Sie diese durch vorsichtiges Erwärmen des Waschpufferkonzentrats auf; sollten Sie die gesamte Menge an Waschpuffer mit einem Mal auflösen, stellen Sie sicher, dass eventuell auskristallisierte Salze nicht im Originalbehältnis verbleiben. Für einen Streifen der Mikrotiterplatte mischen Sie 18 ml destilliertes Wasser mit 2 ml Waschpufferkonzentrat (ergibt 10 ml Waschpuffer, gebrauchsfertig). Für die gesamte Mikrotiterplatte mischen Sie 216 ml destilliertes Wasser mit 24 ml Waschpufferkonzentrat.

Nach dem Gebrauch sind alle nicht verwendeten Reagenzien wieder bei 2-8°C zu lagern.

Während der Testdurchführung ist eine direkte Sonneneinstrahlung zu vermeiden.

Probenvorbereitung

Es kann frisches, kühl aufbewahrtes oder gefroren gelagertes und aufgetautes Blutserum oder Blutplasma verwendet werden. Aufgetaute Proben sind vor der Verwendung gründlich zu durchmischen.

Stellen Sie zunächst eine 1:10-Verdünnung her (10 µl Probe in 90 µl Probenverdünnungspuffer). Mischen Sie die Verdünnung gründlich. Stellen Sie daraus eine 1:30-Verdünnung her (10 µl der 1:10-Verdünnung in 290 µl Probenverdünnungspuffer), so dass die Probe in einer Endverdünnung von 1:300 vorliegt.

Mischen Sie die Verdünnung gründlich.

Um Kreuzkontaminationen zu verhindern ist ein Kontakt der Proben mit den Testkitkomponenten zu verhindern.

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden!

Bei jedem Test ist es notwendig, Positiv- und Negativkontrolle mitzuführen, um die korrekte Testdurchführung und die Stabilität der Reagenzien überprüfen zu können.

Durchführung des Tests

Der Test ist in der angegebenen Reihenfolge und ohne Zeitverzögerung durchzuführen! Bitte verwenden Sie für jeden Pipettierschritt neue, saubere Einwegpipettenspitzen!

- Sämtliche Reagenzien sollen bei Anwendung auf Raumtemperatur (18 bis 25°C) gebracht sein.
- Geben Sie je 100 µl der Kontrollseren (Positivkontrolle und Negativkontrolle) in die dafür vorgesehenen Vertiefungen (Doppelbestimmung wird empfohlen, insbesondere bei einer größeren Probenanzahl).
- Geben Sie 100 µl der vorverdünnten Proben in die dafür vorgesehenen Vertiefungen (Einzelbestimmung).
- Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 60 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- *Erstes Mal Waschen:* Entleeren Sie die Vertiefungen und spülen Sie diese 4-mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer (1:10 hergestellte Verdünnung des 10-fach Waschpuffers). Wenn Sie mit einer Mehrkanal-Pipette waschen, so schlagen Sie die Platte nach jedem einzeltem Waschgang auf einer sauberen saugfähigen Unterlage (z.B. Papierhandtuch) aus; bei Verwendung eines Waschautomaten entfällt das Ausschlagen nach jedem einzelnen Waschschrift. Entfernen Sie am Ende der 4 Waschvorgänge gründlich die Restflüssigkeit durch Ausschlagen der Platte auf einer sauberen saugfähigen Unterlage.
- Geben Sie in jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 60 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C).
- *Zweites Mal Waschen:* Entleeren Sie die Vertiefungen und verfahren weiter wie beim Ersten Mal Waschen (siehe oben).

- Geben Sie in jede Vertiefung 100 μ l Substratlösung. Decken Sie die Platte ab und inkubieren Sie anschließend 15 min bei Raumtemperatur (18 bis 25°C). Beginnen Sie mit der Zeitmessung nach Füllen der ersten Vertiefung.
- Geben Sie 100 μ l Stopplösung in jede Vertiefung, und zwar in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit, in der Sie die Substratlösung zugegeben hatten.
- Schütteln Sie die Platte vorsichtig, aber gründlich bzw. stellen Sie die Schüttel-Funktion im verwendeten Plattenfotometer ein. Messen Sie die Extinktionswerte (OD) innerhalb von 10 min nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm.

Auswertung

Richtwerte zur Überprüfung der korrekten Testdurchführung

- Berechnen Sie die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrollen (PK) und Negativkontrollen (NK) (OD_{PK} , OD_{NK}).
- Berechnen Sie den Prozentsatz (P) der optischen Dichte des Negativkontrollserums nachfolgender Formel:

$$P = \frac{OD_{NK} \cdot 100}{OD_{PK}}$$

- Die Testdurchführung war korrekt, wenn folgende Richtwerte erreicht wurden:
 - Positivkontrollserum PK: $OD_{PK} > 0,8 < 2,8$
 - Negativkontrollserum NK: $P < 20$
- Wenn die geforderten Werte nicht erreicht werden oder das Substrat bereits vor der Zugabe in die Vertiefungen eine starke Blaufärbung aufweisen sollte, so kann dies ein Hinweis auf eine nicht korrekte Testdurchführung, auf Kontamination oder auf Reagenzienverfall sein. Prüfen Sie daher vor einer erneuten Testdurchführung die verwendeten Geräte und Materialien, die Möglichkeit einer Kontamination sowie die Haltbarkeitsdaten der Reagenzien.

Berechnung der Testergebnisse

- Berechnen Sie die Mittelwerte der optischen Dichte der Positivkontrollen (PK) und Negativkontrollen (NK), (OD_{PK} , OD_{NK}).
- Ziehen Sie vom Mittelwert des Positivkontrollserums und von der optischen Dichte der Proben (OD_{Probe}) den Mittelwert des Negativkontrollserums ab.

$$\circ \quad OD_{PK, \text{korr}} = OD_{PK} - OD_{NK}$$

$$\circ \quad OD_{Probe, \text{korr}} = OD_{Probe} - OD_{NK}$$

- Berechnen Sie das Testergebnis = TE der Proben nachfolgender Formel:

$$TE = \frac{OD_{Probe, \text{korr}} \cdot 100}{OD_{PK, \text{korr}}}$$

Bewertung der Testergebnisse

TE < 7 negativ

TE 7 - 12 fraglich

TE > 12 positiv

Interpretation der Testergebnisse

Die Interpretation der Testergebnisse sollte vom behandelnden Tierarzt im veterinärmedizinischen Kontext, vor allem unter Berücksichtigung von Anamnese, klinischer Symptomatik, Titerdynamik (serodiagnostische Folgeuntersuchungen) und differentialdiagnostischer Abgrenzung anderer Krankheitsursachen erfolgen.

Art der Aufbewahrung

Lagern Sie sämtliche Testkit-Bestandteile bei 2 bis 8 °C. Bringen Sie die benötigte Anzahl an Mikrotiterplatten-Streifen und die Reagenzien vor der Benutzung auf Raumtemperatur (18 bis 25 °C). Setzen Sie die Substratlösung auf keinen Fall Sonnen- oder anderem starkem Licht aus! Die Bestandteile des Testkits dürfen nicht mit Bestandteilen aus anderen Chargen oder anderen Testkits vermischt werden.

Vorsichtsmaßnahmen und allgemeine Warnhinweise

Die für ELISA-Tests übliche Umsichtigkeit wie Verwendung sorgfältig gereinigter Gefäße, sorgfältiges Pipettieren und Abarbeiten der einzelnen Testschritte sind Voraussetzung, um korrekte Testergebnisse zu erzielen.

- Einige Bestandteile des Testkits enthalten gefährliche Stoffe (Natriumazid, ProClin 300). Bei der Beseitigung der Abfälle sind die jeweils gültigen gesetzlichen Bestimmungen einzuhalten.
- Dieses Testbesteck ist zum *in vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal unter strikter Einhaltung der Gebrauchsinformation angewandt werden.
- Sämtliche Komponenten des Testbestecks sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.
- Das Mischen von Komponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt.
- Die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt.
- Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen an Natriumazid oder ProClin 300 als Konservierungsmittel. Die Konzentrationen dieser gefährlichen Inhaltsstoffe nach (EG) 1272/2008 liegen unterhalb der gesetzlichen Konzentrationsgrenzwerte. Kontakt mit Schleimhäuten und orale Aufnahme sind zu verhindern.
- Nach Entnahme von Reagenzien sind die Behältnisse unverzüglich wieder zu verschließen und bei 2 bis 8 °C zu lagern. Beachten Sie, dass das Vertauschen von Verschlusskappen, insbesondere der Kontrollseren, zu Kreuzkontaminationen der Testkomponenten und zu ihrer Unbrauchbarkeit führen kann.

- Das Untersuchungsmaterial ist als potenziell infektiös zu betrachten und insofern die gesetzlichen Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.
- In dem Zusammenhang und darüber hinaus sind bei der Testvorbereitung und Durchführung folgende Regeln und allgemeine Hinweise zu befolgen:
 - Nicht essen, trinken oder rauchen!
 - Niemals mit dem Mund pipettieren!
 - Stets Laborkittel und Schutzhandschuhe tragen!
 - Sicherheitshinweise zu den entsprechenden Testkomponenten beachten!
 - Gebrauchsanweisung strikt befolgen!
 - Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise zur Kenntnis nehmen und befolgen!
 - Bei der Ausführung des Testkits in (halb)automatisierter Form, z. B. bei Verwendung von Pipettierautomaten oder Laborrobotern, ist die Methode zu validieren.
 - Eine Kombination dieses Testkits mit Produkten oder Komponenten anderer Hersteller ist nicht zulässig und kann zu falschen Testergebnissen führen.

Haftung

Das Haftungsrisiko im Zusammenhang mit der Verwendung dieses Produkts liegt vollständig beim Käufer. Der Hersteller übernimmt keine Haftung für Schäden jedweder Art, die aus der Verwendung des Testkits, aus der Testdurchführung oder aus der Auswertung und Interpretation der mit dem Produkt ermittelten Testergebnisse resultieren.

Nur für den tierärztlichen Gebrauch.

Symbole



Bestellnummer



Haltbarkeit



Chargennummer



Lagertemperatur



Hersteller



Vor Sonnenlicht schützen



Gebrauchsinformation beachten



Vor Feuchtigkeit schützen



Nicht zur Wiederverwendung



Probenanzahl

96

Änderungsindex

Gebrauchsinformation	Version	Änderung
HB-2609-DE-008	Dezember 2022	Anpassung an INDICAL Design und Implementierung neuer Kitgröße
LED-V7	März 2021	

Notizen

INDICAL
BIOSCIENCE

Ordering: www.indical.com/contact
Technical Support: support@indical.com
Website: www.indical.com