



Nicht für den Verkauf oder Vertrieb in den Vereinigten Staaten von Amerika

## **Panbio Leptospira Igm ELISA**

Cat. No. 02PE10/02PE11

DEUTSCH

**VORGEGEHENER VERWENDUNGSZWECK**

Der Panbio Leptospira IgM ELISA dient dem qualitativen Nachweis von IgM-Antikörpern gegen Leptospira im Serum zur Unterstützung der klinischen Labordiagnose von Patienten mit klinischer Leptospirose-Symptomatik.

**EINLEITUNG**

Leptospirose ist eine akute Infektionskrankheit bei Menschen und Tieren. Sie wird durch Spirochäten der Gattung *Leptospira* hervorgerufen. Aktuell gibt es mehr als 250 pathogene Serovare der Gattung *leptospira interrogans*<sup>1</sup>.

Das Erscheinungsbild der Infektion kann von subklinisch bis schwer reichen<sup>2</sup>. Der Ausbruch erfolgt in der Regel plötzlich mit Symptomen wie Kopf-, Muskel- und Bauchschmerzen, Fieber, konjunkivaler Infektion und Meningitis. Besonders bei verzögerter Diagnose und Behandlung kann es zu schweren Komplikationen wie hepatorenalem Syndrom und der Beteiligung des zentralen Nervensystems kommen. Weitere dokumentierte Symptome sind Depressionen und Reizbarkeit<sup>3</sup>.

Bei Leptospirose ist der Mann der zufällige Wirt und wird durch den Kontakt mit Urin oder Gewebe infizierter Tiere (z. B. Nutztiere) oder über Wasser und Böden, die durch tierischen Urin verunreinigt sind, infiziert. Der Organismus tritt über Schmitze, Abschürfungen oder Schiermhäute in den Körper ein. Infektionen können daher in Verbindung mit Aktivitäten in Beruf und Freizeit auftreten. Die Übertragung vom Mensch zu Mensch ist eher selten.

IgM-Antikörper treten bereits 3 Tage nach der Infektion auf und persistieren bis zu 5 Monate. Es sind jedoch Benchite vorhanden, die zeigen, dass IgM-

Antikörper über Jahre oder lebenslang bestehen bleiben<sup>4</sup>.

Der Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen genusspezifische *Leptospira*-Antigene mit ELISA ist ein wertvolles Verfahren für die Diagnose akuter Infektionen<sup>5,6</sup>. Dies ist eine Alternative zu genusspezifischen Komplementfixierungs- und Agglutinationstests. Das Vorhandensein signifikanter oder steigender IgM-Werte ist als präsumptiver Nachweis einer aktiven *Leptospira*-Infektion zu betrachten.

Mit dem Panbio Leptospira IgM ELISA wurden Infektionen mit verschiedenen *L. interrogans*-Serovaren nachgewiesen, wie z. B.: *hardjo*, *pomona*, *capeniageni*, *australis*, *madanesis*, *kremastos*, *nokolaeva*, *celledoni*, *canicola*, *grippityphosa*, *szwajtzak*, *djasiman* und *tarassovi*<sup>4</sup>.

**TESTPRINZIP**

Im Serum enthaltene Antikörper gegen *Leptospira*-Antigene, falls vorhanden, binden sich an *Leptospira*-Antigene, die sich auf der Polystyrol-Oberfläche der Mikrotiterstreifen befinden. Serumreste werden abgewaschen, und mit Peroxidase konjugiertes Anti-Human-IgM wird hinzugefügt. Die Kavitäten werden gewaschen und ein farblooses Substratsystem, Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxid (TMB-Chromogen), wird zugegeben. Das Substrat wird vom Enzym hydrolysiert, und das Chromogen nimmt eine blaue Farbe an. Nach Stoppen der Reaktion mit Säure verfärbt sich das TMB gelb. Die Farbentwicklung weist auf das Vorhandensein von IgM-Antikörpern gegen *leptospira* in der Testprobe hin.

**IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN**

**Hinweis: 02PE11 = 5 x 02PE10**  
1. Mit *Leptospira*-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen (12x8

Kavitäten). Gebrauchsfertig. Unbenutzte Kavitäten sofort wieder verschließen und mit einem Trockenmittel aufbewahren. Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil.

**Waschpuffer (20x)** – 1 Flasche, 60 ml 20x-Konzentrat aus phosphatpufferter Kochsalzlösung (pH 7,2 – 7,6) und Tween 20 mit Konservierungsmittel (0,1 % Proclin™). Bei niedrigen Temperaturen kann es zur Kristallisation kommen. Um dieses Problem zu beheben, bei 37°C inkubieren, bis die Lösung klar ist. Gründlich mischen. Einen Teil Waschpuffer mit 19 Teilen destilliertem Wasser verdünnen. Der verdünnte Waschpuffer kann bei 2 – 25°C eine Woche lang aufbewahrt werden. ⚠

**Probenverdünner** – 2 Flaschen, 50 ml (PINK). Gebrauchsfertig. Trisgepufferte Kochsalzlösung (pH 7,2 – 7,6) mit Konservierungsmittel (0,1 % Proclin™) und Zusatzstoffen. Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil. ⚠

**Mit HRP konjugiertes Anti-Human-IgM** – 1 Flasche, 15 ml (Gelb). Gebrauchsfertig. Mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Ziegen-Anti-Human-IgM mit Konservierungsmittel (0,1% Proclin™) und Proteinstabilisatoren. Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil. ⚠

**TMB-Chromogen (TMB)** – 1 Flasche, 15 ml. Gebrauchsfertig. Eine Mischung aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in Zitronensäure/Pufferlösung (pH 3,5 – 3,8). Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil.

**Reaktionskontrolle** – 1 Fläschchen mit schwarzer Verschlusskappe, 200 µl Humanserum (enthält 0,1% Natrumazid und 0,005% Geniamyconsulfat). Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil.


**Kalibrator** – 1 Fläschchen mit orangefarbener Verschlusskappe, 400 µl Humanserum (enthält 0,1% Natrumazid und 0,005% Geniamyconsulfat). Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil.

**Negativkontrolle** – 1 Fläschchen mit weißer Verschlusskappe,

200 µl Humanserum (enthält 0,1% Natrumazid und 0,005% Geniamyconsulfat). Bei 2 – 8°C bis zum Verfallsdatum stabil.  
**Stopplösung** – 1 Flasche mit roter Verschlusskappe, 15 ml. Gebrauchsfertig, 1M Phosphorsäure. Bei 2 – 25°C bis zum Verfallsdatum stabil.

**Proclin™ 300 ist ein etikettiertes Warenzeichen von Rohm and Haas.**

\* Klassifikation gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008:

<b>Produkt-Identifikator</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Klassifikation</b>
<b>Gefahrstoff</b>	Proclin 300 (5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1), CAS No. 55965-84-9)	
<b>Klassifizierung</b>	AzReizwirkung auf die Haut Kategorie 2 Schwere Augenschädigung/-reizung Kategorie 2 Hautsensibilisierung Kategorie 1	
<b>Gefahrheitskategorie</b>		
<b>Signalwort</b>	Achtung	
<b>H-Sätze</b>	H315: Verursacht Hautreizungen H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen H319: Verursacht schwere Augenreizung	

<b>P-Sätze</b>	
<b>Vermeidung</b>	P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden P284: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen P272: Kontaminierte Arbeitskleidung sollte außerhalb des Arbeitsplatzes verborgen werden P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Geschlechtsschutz tragen
<b>Reaktion</b>	P302+P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen, Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen P321: Besondere Behandlung P332+P313: Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen P333+P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen P337+P313: Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen P362: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen P363: Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen/entfernen
<b>Entsorgung</b>	P501: Inhalt/Behälter in Übereinstimmung mit den entsprechenden lokale/nationalen/internationalen Bestimmungen entsorgen

**WEITERE ERFORDBERLICHE MATERIALIEN (NICHT IM TESTKIT ENTHALTEN)**

1. Genaue, einstellbare Mikropipetten mit Einwegpipettenspitzen (5 – 1000 µl Fassungsvermögen)
2. Entionisiertes Wasser

3. Waschanlage für Mikrotiterplatten
4. Mikrotiterplattentester mit 450 nm filter
5. Zeitmesser
6. Messzylinder
7. Flasche
8. Reagenzröhrchen oder Mikrotiterplatte für Serumverdünnungen

**VORSICHTSHINWEISE  
IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM**

1. Alle zur Zubereitung der Kontrollseren verwendeten menschlichen Ausgangsstoffe wurden auf Antikörper gegen das humane Immunschwächevirus 1 und 2 (HIV 1 und 2), Hepatitis-C-Virus (HCV) sowie Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und als negativ befunden. Da jedoch keine Testmethode die Abwesenheit infektiöser Substanzen garantieren kann, sollten alle humanen Kontrollseren sowie antigenbeschichteten Kavitäten als potenziell infektiöses Material behandelt werden. Gemäß den Empfehlungen der Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health (USA) ist potenziell infektiöses Material bei Biosicherheitsstufe 2 zu handhaben.
2. Diesen Test nur an Serum durchführen. Für die Verwendung an Vollblut, Plasma oder anderem Problemmaterial liegen keine Daten vor.
3. Keine Ikterischen oder lipämischen Seren bzw. Seren mit Anzeichen von Hämolyse oder Keimwachstum verwenden. Seren nicht hitzenaktivieren.
4. Alle Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 – 25°C) erreichen lassen. Temperaturschwankungen beeinträchtigen den Test. Die Kavitäten (Mikrotiterstreifen) erst aus dem geschlossenen Beutel nehmen, wenn sie Raumtemperatur (20 – 25°C) erreicht haben.

6. Reagenzien mithilfe sauberer Pipettenspitzen direkt aus der Flasche dispensieren. Ein Umrühren der Reagenzien kann zu Kontaminationen führen.
7. Unbenutzte Kavitäten sofort wieder verschließen und mit einem Trockenmittel aufbewahren. Andernfalls kann es zu falschen Ergebnissen kommen.
8. Substratsystem:
  - (a) Da TMB für die Kontamination durch Metallionen anfällig ist, darf das Substratsystem nicht mit Metall in Berührung kommen.
  - (b) Nicht über längere Zeit direkter Lichteinwirkung aussetzen.
  - (c) Bestimmte Reinigungsmittel können die Leistung von TMB beeinträchtigen.
  - (d) TMB kann eine leicht blaue Farbe aufweisen. Die Aktivität des Substrats bzw. die Ergebnisse des Assays werden dadurch nicht beeinträchtigt.



9. Einige Komponenten des Kits können Natriumazid enthalten. Dieser Stoff kann mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazidverbindungen bilden. Bei Entsorgung dieser Reagenzien durch die Kanalisation sollte mit großen Mengen Wasser nachgespült werden, um Azidansammlungen in den Abflusssystemen zu verhindern. Natriumazid hemmt die Aktivität des Konjugats. Zum Hinzufügen von Konjugat müssen daher frische Pipettenspitzen verwendet werden, damit kein Natriumazid von anderen Reagenzien übertragen wird.
- 10.

**PROBENTNAHME UND –VORBEREITUNG**

Durch Venenpunktion gewonnenes Blut bei Raumtemperatur (20 – 25°C) gerinnen lassen und dann gemäß den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI – Approved Standard – Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture, H3) zentrifugieren.

Das Serum sollte so bald wie möglich getrennt und anschließend gekühlt (bei 2 – 8°C) oder tiefgefroren (≤-20°C) aufbewahrt werden, wenn es nicht innerhalb von 2 Tagen getestet wird. Zur Aufbewahrung keine Gefrierschänke mit Abtauautomatik verwenden. Keine ikterischen oder lipämischen Seren bzw. Seren, die Anzeichen von Hämolyse oder Keimwachstum aufweisen, verwenden. Das CLSI gibt Empfehlungen zur Aufbewahrung von Blutproben (Approved Standard – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18).

**TESTABLAUF**

**Hinweis:** **Achten Sie darauf, dass alle Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 – 25°C) angenommen haben.** Eine Durchführung des Assays außerhalb der vorgegebenen Zeit- und Temperaturbereiche kann zu ungenügenden Ergebnissen führen. Assays, die nicht innerhalb der festgelegten Zeiträume und Temperaturbereiche durchgeführt werden, müssen wiederholt werden.

**ELISA–VERFAHREN**

1. Die benötigte Anzahl Mikrotiterstreifen aus dem Folienbeutel nehmen und in den Streifenhalter einsetzen. Fünf Kavitäten werden benötigt für: Negativkontrolle (N), Positiv-Reaktionskontrolle (PR) und Kalibrator (CAL) in dreifacher Ausführung. Achten Sie

2. darauf, unbenutzte Mikrotiterstreifen luftdicht im Folienbeutel aufzubewahren.  
 Negativkontrolle, Reaktionskontrolle und Kalibrator in dreifacher Ausfertigung und Patientenproben unter Verwendung geeigneter Teströhrchen oder einer Mikrotiterplatte verdünnen. Positivkontrolle, Negativkontrolle, Kalibrator und Patientenproben unter Verwendung geeigneter Teströhrchen oder einer Mikrotiterplatte verdünnen.  
 (a) Zu 10 µl Serum 1000 µl Probenverdünner hinzugeben. Gründlich mischen.  
 (b) Zu 10 µl Serum 90 µl Probenverdünner hinzugeben. Zu 20 µl des verdünnten Serums 180 µl Probenverdünner hinzugeben. Gründlich mischen.

3. 100 µl der verdünnten Patientenprobe, Kontrollen und Cut-off-Kalibratorserum in die jeweiligen Kavitäten der Assayplatte pipettieren.  
 Assayplatte abdecken und bei 37°C ± 1°C 30 Minuten inkubieren.  
 (a) Sechs (6) Mal mit verdünntem Waschpuffer waschen (siehe die Informationen zum Waschverfahren weiter unten).  
 100 µl des mit HRP konjugierten Anti-Human-IgM in jede Kavität pipettieren.  
 Assayplatte abdecken und bei 37°C ± 1°C 30 Minuten inkubieren.  
 Sechs (6) Mal mit verdünntem Waschpuffer waschen (siehe die Informationen zum Waschverfahren weiter unten).  
 100 µl TMB in jede Kavität pipettieren.  
 10 Minuten bei Raumtemperatur (20 – 25°C) inkubieren

4	N	4
5	P	5
6	CAL	6
7	CAL	7
8	CAL	8
9	1	9
10	2	10
11	3	11

11. (die Zeitmessung beginnt mit der ersten Zugabe). Eine Blaularbung tritt ein.  
 100 µl der Stopplösung in alle Kavitäten pipettieren. Die gleiche Reihenfolge und Zeitmessung verwenden wie für TMB. Gründlich mischen. Die blaue Farbe wechselt zu Gelb.  
 12. Innerhalb von 30 Minuten die Extinktion der einzelnen Kavitäten bei einer Wellenlänge von 450 nm und mit einem Referenzfilter von 600 – 650 nm ablesen.

**Hinweis:** Falls ein Spektrophotometer mit zwei Wellenlängen verfügbar ist, den Referenzfilter zwischen 600 und 650 nm einstellen. Ein Ablesen der Kavitäten bei 450 nm ohne Referenzfilter kann zu höheren Extinktionswerten wegen Hintergrund führen.

**WASCHVERFAHREN**

Ein gründliches Waschen ist entscheidend für das ELISA-Verfahren, um alle Probenreste oder Komponenten, die keine Komplexe gebildet haben, zu entfernen.

- A. **Plattenwaschautomat**
- Alle Kavitäten vollständig aspirieren.
  - Alle Kavitäten während des Waschzyklus bis zum Rand (350 µl) füllen.
  - Nach Abschluss der sechs (6) Spülzyklen die Platte umdrehen und fest auf einem saugfähigen Papierhandtuch ausklopfen, um den Waschpuffer vollständig zu entfernen.
  - Plattenwaschautomaten sind regelmäßig zu warten, damit die Platten gründlich gereinigt werden. Grundsätzlich sind die Reinigungsanweisungen des Herstellers zu beachten.

**B. Manuelles Waschen**

- Den Inhalt der Platte in einen geeigneten Abfallbehälter entsorgen.
- Die Kavitäten mit Waschpuffer füllen. Dazu eine geeignete Spritzflasche verwenden. Darauf achten, dass der Waschpuffer nicht schäumt, da dies die Reinigungswirkung beeinträchtigt. Waschpuffer sofort aus den Kavitäten ausgießen.
- Kavitäten erneut mit Waschpuffer füllen und sofort entleeren.
- Schritt (3) weitere vier Mal wiederholen. Insgesamt müssen sechs (6) Waschvorgänge mit dem Waschpuffer durchgeführt werden.
- Nach Abschluss des Spülzyklus die Kavitäten entleeren und die Platte auf einem saugfähigen Papierhandtuch ausklopfen, um sicherzustellen, dass der Waschpuffer vollständig entfernt wurde.

**BERECHNUNGEN**

**WICHTIGER HINWEIS: Der Kalibrationsfaktor ist chargenspezifisch und wird im Datenblatt angegeben. Vor Beginn der Berechnungen den Kalibrationsfaktor nachlesen.**

- Die durchschnittliche Extinktion des in dreifacher Ausführung ermittelten Kalibratorwerts berechnen und mit dem Kalibrationsfaktor multiplizieren. Dies ist der Grenzwert (Cut-off). Der Indexwert kann berechnet werden, indem die Extinktion der Probe durch den oben in Schritt (1) berechneten Cut-off-Wert dividiert wird.
- Alternativ dazu können Panbio-Einheiten durch Multiplikation des oben in Schritt (2) berechneten Indexwerts mit 10 ermittelt werden.

**Indexwert = Extinktion der Probe**

**Beispiel:** Extinktion von Probe A = 0,949  
 Extinktion von Probe B = 0,070

Mittlere Extinktion des Kalibrators = 0,802  
 Kalibrationsfaktor = 0,62  
 Cut-off-Wert = 0,802 x 0,62 = 0,497

Probe A (0,949/0,497) = Indexwert 1,91  
 Probe B (0,070/0,497) = Indexwert 0,14  
 Cut-off-Wert = Indexwert x 10

**Panbio-Einheiten**

Probe A 1,91 x 10 = 19,1 Panbio-Einheiten  
 Probe B 0,14 x 10 = 1,4 Panbio-Einheiten

**QUALITÄTSKONTROLLE**

Jedes Kit enthält einen Kalibrator sowie Reaktions- und Negativkontrollen. Akzeptable Werte dafür bitte dem beiliegenden Datenblatt entnehmen. Die Negativ- und Reaktionskontrollen dienen der grundlegenden Überprüfung der Reagenzienaktivität. Die Reaktionskontrolle kann keine präzisen Angaben über die Cut-off-Werte des Tests liefern. Wenn die Extinktionswerte für die Kontrollen oder den Kalibrator nicht den Spezifikationen entsprechen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Bei einem ungültigen Test können die Patientenergebnisse nicht verwendet werden.  
 Die Qualitätskontrolle muss in Übereinstimmung mit den Anforderungen kommunaler, einzel- oder bundessaadlicher Behörden sowie den im jeweiligen Labor üblichen Standardverfahren zur Qualitätssicherung durchgeführt werden.  
 Angaben zu ordnungsgemäßen Qualitätskontrollpraktiken bitte den CLSI-



Dokumenten C24-A und 42\_CFR\_493\_1256 entnehmen.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

INDEX	PANBIO-EINHEITEN	ERGEBNIS
<0.9	<9	Negativ
0.9 - 1.1	9 - 11	Nicht eindeutig
>1.1	>11	Positiv

ERGEBNIS	AUSWERTUNG
<b>Negativ</b>	Kein nachweisbarer IgM-Antikörper. Werden spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen und besteht der Verdacht auf eine aktuelle Infektion, kann diese 7 - 14 Tage später mittels Testen einer weiteren Probe bestätigt werden.
<b>Nicht eindeutig</b>	Nicht eindeutige Proben sollten erneut getestet werden. Proben, die auch nach einem Wiederholungstest noch nicht eindeutig sind, sollten mit einer alternativen Methode getestet werden, oder dem Patienten sollte eine neue Probe zum Testen entnommen werden.
<b>Positiv</b>	Vorliegen von nachweisbarem IgM-Antikörper.

Empfohlene Angabe der erzielten Testresultate: Die folgenden Ergebnisse wurden mit dem Panbio Leptospira IgM ELISA erzielt. Mit anderen Testmethoden bestimmte Werte sind nicht untereinander austauschbar. Das den Cut-off-Wert übersteigende Messergebnis gibt

nicht die vorhandene Gesamtmenge an Antikörpern an." Das Ergebnis ist als positiv, negativ oder nicht eindeutig zu bewerten und nicht als numerischer Wert anzugeben.

**TESTBESCHRÄNKUNGEN UND ERWARTETE WERTE**

- Die klinische Diagnose muss unter Beachtung der klinischen Anzeichen und Symptome des Patienten erfolgen. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse stellen für sich keine Diagnose dar und sind in Kombination mit anderen klinischen Daten und Symptomen des Patienten auszuwerten.
- Ergebnisse von immunsupprimierten Patienten sind mit Vorsicht zu bewerten.
- Es sollten keine Screeningtests der Allgemeinbevölkerung durchgeführt werden. Der Vorhersagewert eines positiven Ergebnisses hängt von der Wahrscheinlichkeit der Organismuspresenz ab. Tests nur an Patienten mit klinischen Symptomen oder bei Verdacht auf Exposition durchführen.
- Die Seroprevalenz von Leptospiren variiert in verschiedenen geographischen Regionen. Folglich muss der Cut-off-Wert möglicherweise basierend auf örtlichen Studien angepasst werden.
- Die Leistungscharakteristika des Tests für visuelle Ergebnisbestimmungen wurden bisher nicht erforscht.
- Bei Leptospirose sind in der Regel 5 bis 10 Tage nach Ausbruch der Krankheit IgM-Antikörper vorhanden. Das Vorhandensein spezifischer IgM-Antikörper in einer einzelnen Probe kann auf eine aktuelle Infektion hinweisen. Ein positives Ergebnis in einer einzelnen Probe ist als eine aktuelle Infektion oder, falls ein unterstützendes klinisches Erscheinungsbild vorliegt, als präsumptive Diagnose zu bewerten.

- Steigende Werte spezifischer Antikörper in gepaarten Seren können als serologische Nachweis einer aktuellen Infektion bewertet werden. Kann kein Anstieg oder Abfall spezifischer IgM-Antikörper-Werte in nacheinander entnommenen Serumproben nachgewiesen werden, ist eine aktuelle Infektion mit Leptospira spp auszuschließen.
- Dieser Test ist als Screeningtest konzipiert. Daher kann bei einem geringen Prozentsatz der Patienten mit anderen akuten Infektionen (z. B. O-Fieber) ein positives Testergebnis angezeigt werden. Folglich sollten alle Seren mit positivem Ergebnis zur Bestätigung IgM-spezifischer Antikörper und zur epidemiologischen Erfassung an ein Referenzlabor gesendet werden.

**LEISTUNGSDATEN**

252 gekennzeichnete Seren wurden mit dem Panbio Leptospira IgM ELISA im Rahmen einer internen Studie getestet. Das MAT-charakterisierte Serum enthält 57 seropositive und 195 seronegative Leptospira-Proben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1**  
**Serologische Sensitivität und Spezifität des Panbio Leptospira IgM ELISA**

Charakterisierung der Seren	Panbio ELISA		Gesamt
	Positiv	Negativ	
Seropositiv (+)	55	2	57
Seronegativ (-)	3	192	195
<b>Gesamt</b>	<b>58</b>	<b>194</b>	<b>252</b>

**Serologische Sensitivität** = 55/57 = 96,5%  
**Serologische Spezifität** = 192/195 = 98,5%  
**Serologische Übereinstimmung** = 247/252 = 98,0%

95% KI\*  
 87,9 - 98,6%  
 95,6 - 99,7%  
 95,4 - 98,3%

Konfidenzintervall

**Hinweis:** Die "serologische" Sensitivität und Spezifität bezieht sich auf den Vergleich von Panbio Assay-Ergebnissen mit anderen Assays, die normalerweise zur Diagnose von Leptospirose verwendet werden. Es wurde kein Versuch unternommen, die Assay-Ergebnisse mit dem Vorhandensein oder dem Nicht-Vorhandensein der Krankheit in Beziehung zu setzen. Über die Genauigkeit des Vergleichs bezüglich der Vorhersage der Krankheit kann keine Beurteilung erfolgen. Da die obigen Studien retrospektiv mit einer vorausgewählten Population durchgeführt wurden, können keine Berechnungen bezüglich des prognostischen positiven und negativen Werts angestellt oder erschlossen werden.

**REPRODUZIERBARKEIT**

Die Reproduzierbarkeit des Panbio Leptospira IgM ELISA Tests wurde anhand des Testens von 8 Seren nachgewiesen (je drei Tests mit je drei Panbio Chargen an drei verschiedenen Tagen). Die Genauigkeiten innerhalb des jeweiligen Testlaufs, im Tagesvergleich und im Chargenvergleich wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA Typ II) ermittelt und wird in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2**  
**Ergebnisse der Reproduzierbarkeit**  
**Panbio Leptospira Igm ELISA**  
**Genauigkeitsswerte (Anhand des Indexwerts\*)**

Probe	n	Mittelwert	Innerhalb des Testlaufs		Während des Tages		Tages-Charge		Gesamt	
			SA	VK	SA	VK	SA	VK	SA	VK
Positiv	27	2,42	0,14	5,7%	0,07	3,0%	0,09	3,8%	0,17	6,9%
Schwächenwert	27	1,00	0,03	3,4%	0,00	0,0%	0,00	0,0%	0,03	3,2%
Negativ	27	0,09	0,01	10,3%	0,00	3,2%	0,00	0,0%	0,01	10,6%
#1	27	3,31	0,19	5,6%	0,19	5,7%	0,67	20,1%	0,60	18,3%
#2	27	3,33	0,16	4,9%	0,13	3,8%	0,63	18,9%	0,56	16,8%
#3	27	2,91	0,22	7,6%	0,16	5,5%	0,76	26,3%	0,69	23,6%
#4	27	1,53	0,10	6,6%	0,00	0,0%	0,31	20,9%	0,27	17,6%
#5	27	1,03	0,05	4,5%	0,03	3,3%	0,19	18,9%	0,17	16,6%
#6	27	1,36	0,11	8,2%	0,06	4,2%	0,18	13,1%	0,19	14,1%
#7	27	0,95	0,08	7,9%	0,04	4,6%	0,06	6,2%	0,10	10,2%
#8	27	0,77	0,05	6,5%	0,00	0,0%	0,04	5,2%	0,06	7,8%

Alle Werte werden aus den Indexwerten berechnet (Cut-off anhand OD)  
 SA = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient

**Hinweis:** Die Standardabweichung wurde aus Darstellungsgründen auf zwei Dezimalstellen gerundet.  
 Der Indexwert wird durch Division der Probenextinktion durch den Cut-off-Wert berechnet.

**KREUZREAKTIVITÄT**

Anhand von 60 Proben von Patienten mit nachgewiesenen Krankheiten (außer Leptospirose) wurde die analytische Spezifität des Panbio

Leptospira Igm ELISA untersucht. Die Proben stammten von Patienten mit Krankheiten, bei denen es potenziell zu einer Kreuzreaktivität kommen kann. Jede der in der Studie verwendeten Proben wurde im Hinblick auf die Diagnose vor der Analyse mit dem Panbio Leptospira Igm ELISA charakterisiert. Eine Übersicht der Ergebnisse finden Sie in Tabelle 3.

**Tabelle 3**  
**Kreuzreaktivitätsanalyse –**  
**Panbio Leptospira Igm ELISA**

Krankheit	Proben gesamt	Panbio ELISA Positives Ergebnis
Epstein-Barr-Virus	10	0/10
Ross-River-Virus	10	0/10
Brucellen	10	0/10
Influenza A	7	0/7
Influenza B	7	1/7
Q-Fieber	6	1/6
Tsutsugamushi-Fieber	10	2/10
<b>Gesamt</b>	<b>60</b>	<b>4/60</b>

**STÖRUNGSBEHEBUNG**

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Hohe Extinktion	1. Kreuzkontamination durch andere Proben. 2. Unzureichendes/ineffizientes Waschen oder Fehler beim Ablesen. 3. Falsche Filler-Wellenlänge. 4. Hohe Hintergrundextinktion. 5. Kontaminiertes TMB-Substrat. 6. Inkubationszeit zu lang oder Inkubationstemperatur zu hoch. 7. Falsche Verdünnung des Serums.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assay wiederholen und beim Waschen und Pipettieren besonders vorsichtig vorgehen.</li> <li>Funktion des Waschautomaten prüfen.</li> <li>Die Wellenlänge muss 450 nm betragen. Falls ein Spektrophotometer mit zwei Wellenlängen verfügbar ist, den Referenzfilter zwischen 600 und 650 nm einstellen.</li> <li>Assay unter Verwendung einer Kavität wiederholen, die nur Probenverdünnung oder Probenabrens enthält (d. h. Leerwertprobe).</li> <li>TMB-Substrat muss farblos oder leicht blau sein.</li> <li>Inkubationszeit und -temperatur prüfen.</li> <li>Inkubator auf korrekte Temperatur prüfen.</li> <li>Assay mit korrekten Serumverdünnungen wiederholen.</li> </ul>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Niedrige Extinktion	1. Inkubationszeit zu kurz oder Inkubationstemperatur zu niedrig. 2. Fehler bei der Verdünnung oder Pipettierung der Seren. 3. Falsche Filler-Wellenlänge. 4. Kontaminierte Konjugatadsung.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bei der Assay-Inkubation auf die richtige Dauer und Temperatur achten.</li> <li>Inkubator auf Einstellung der korrekten Temperatur prüfen.</li> <li>Test mit korrekten Verdünnungen und Mengen wiederholen.</li> <li>Sicherstellen, dass die Kontrollseren ausreichend gemischt sind.</li> <li>Die Wellenlänge muss auf 450 nm eingestellt sein. Falls ein Spektrophotometer mit zwei Wellenlängen verfügbar ist, den Referenzfilter zwischen 600 und 650 nm einstellen.</li> <li>Konjugat mithilfe einer sauberen Pipettenspitze direkt aus der Flasche dispensieren; in einen anderen Behälter möglichst vermeiden.</li> <li>Übrig gebliebenes Konjugat nicht wieder in die Flasche füllen.</li> <li>Alle zum Dispensieren von Konjugat verwendeten Pipetten und Spenden müssen sauber sein und dürfen kein Serum, Reinigungs- oder Bleichmittel enthalten.</li> </ul>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Niedrige Extinktion	5. Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen. 6. Hohe Ablesewerte bei der Luft-Leerwertprobe. 7. Kit falsch gelagert. 8. Reagenzien des Kits nicht auf Raumtemperatur. 9. Falsche Reagenzien verwendet. 10. Platte zu lange gewaschen (z. B. langes Einweichen). 11. Platte nach dem Serum-Inkubationsschritt nicht ausreichend gewaschen (d. h. unzureichendes Waschen während der Waschschritte).	<ul style="list-style-type: none"> <li>Verfallsdatum prüfen. Kit nicht verwenden, wenn das Verfallsdatum überschritten ist.</li> <li>Ursachen für die hohe Hintergrundextinktion untersuchen.</li> <li>Das Kit bei muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Überprüfen, ob die Platte versiegt und der Beutel mit dem Trockenmittel blau/weiß ist.</li> <li>Die Reagenzien vor dem Assay ausreichend lange Raumtemperatur annehmen lassen.</li> <li>Überprüfen, ob die auf dem Sicherheitsdatenblatt angegebenen Reagenzien verwendet wurden.</li> <li>Assay mit dem empfohlenen Waschverfahren wiederholen.</li> <li>Assay mit dem empfohlenen Inkubationsverfahren wiederholen.</li> </ul>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Unzulängliche Duplikate	1. Proben nicht ausreichend gemischt. 2. Ungenaue Pipette. 3. Hinzufügen von Reagenzien in unterschiedlichen Zeitabständen oder zu langsamem Hinzufügen; Bildung von Luftblasen bei der Reagenzengabe. 4. Unzulänglicher Waschvorgang; Waschpufferreste in den Kavitäten, unentleertes oder nicht ausreichendes Waschen. 5. Leser wurde vor dem nicht kalibriert oder nicht auf Betriebstemperatur gebracht.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reagenzien vorsichtig mischen und Raumtemperatur annehmen lassen.</li> <li>Kalibrierung muss u. U. überprüft werden.</li> <li>Pipettentechik überprüfen – einzelnen Proben zwischen den und überschüssige Flüssigkeit von der Außenseite der Spitze abwischen.</li> <li>Reagenzien in gleichmäßigen Zeitabständen hinzufügen.</li> <li>Alle Verdünnungen vor Beginn der Reagenzengabe ansetzen.</li> <li>Pipettentechik und -geschwindigkeit verbessern.</li> <li>Waschpuffer nach dem Waschen herausdöpfen.</li> <li>Darauf achten, dass die Kavitäten beim Waschen ausreichend und gleichmäßig gefüllt und aspiriert werden.</li> <li>Präzision des Lesers prüfen.</li> <li>Leser wurde vor dem Vorwarmperiode der Gebrauchsanleitung des Geräts entnehmen.</li> </ul>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Unzulängliche Duplikate	<p>6. Optischer Pfad nicht sauber.</p> <p>7. Flüssigkeit aus den Kavitäten verschüttet.</p> <p>8. Serumproben weisen Keimwachstum, Hämolyse oder Lipämie auf.</p> <p>9. Durch Verdunstung uneinheitliche Mengen in den Kavitäten.</p>	<p>▶ Unterseite der Platte vorsichtig abwischen.</p> <p>▶ Überprüfen, ob Lichtquelle und Detektor sauber sind.</p> <p>▶ Assay wiederholen. Dabei nicht an die Platte stoßen und keine Flüssigkeit verschütten.</p> <p>▶ Keine Serumproben mit Keimwachstum, Hämolyse oder Lipämie verwenden.</p> <p>▶ Platte mit einem Deckel oder einer Abdichtfolie (nicht im Lieferumfang enthalten) verschließen.</p>
Alle Kavitäten sind gelb	<p>1. Kontaminiertes TMB-Substrat.</p> <p>2. Kontaminierte Reagenzien (z. B. Konjugat, Waschpuffer).</p> <p>3. Falsche Verdünnung des Serums.</p>	<p>▶ TMB-Substrat muss farblos oder leicht blau sein.</p> <p>▶ Reagenzien auf Trübung prüfen.</p> <p>▶ Assay mit korrekten Serumverdünnungen wiederholen.</p>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Alle Kavitäten sind gelb	<p>4. Kit falsch gelagert.</p> <p>5. Unzulänglicher Waschvorgang; Waschpufferreste in den Kavitäten; uneinheitliches oder nicht ausreichendes Waschen.</p> <p>6. Falls Konjugat-Rekonstitution erforderlich – Fehler bei Konjugat-Rekonstitution.</p>	<p>▶ Das Kit bei muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Überprüfen, ob die Platte versiegelt und der Beutel mit dem Trockenmittel blauviolett ist.</p> <p>▶ Waschpuffer nach dem Waschen herauskopfen. Darauf achten, dass die Kavitäten beim Waschen ausreichend und gleichmäßig gefüllt und aspiriert werden.</p> <p>▶ Assay wiederholen und dabei auf Konjugat-Rekonstitution in Übereinstimmung mit dem Assay-Verfahren achten.</p>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Alle Kavitäten negativ	<p>1. Test nicht korrekt durchgeführt – falsche Reagenzien oder Reagenzien in der falschen Reihenfolge zugegeben.</p> <p>2. Kontaminierte Konjugatlösung.</p> <p>3. Platte zu lange gewaschen (z. B. langes Einweichen).</p>	<p>▶ Verfahren prüfen und auf nicht verwendete Reagenzien achten.</p> <p>▶ Die Stopplösung darf nicht vor dem Konjugat oder TMB zugegeben werden.</p> <p>▶ Serum immer mit der richtigen Probenverdünnung verdünnen; z. B. für einen IgG ELISA kein Probenabsorbens verwenden.</p> <p>▶ Konjugat mithilfe einer sauberen Pipettenspitze direkt aus der Flasche dispensieren; Umtüllen des Konjugats in einen anderen Behälter möglichst vermeiden. Übrig gebliebenes Konjugat nicht wieder in die Flasche füllen.</p> <p>▶ Alle zum Dispensieren von Konjugat verwendeten Pipetten und Sonden müssen sauber sein und dürfen kein Serum, Reinigungs- oder Bleichmittel enthalten.</p> <p>▶ Assay mit dem empfohlenen Waschverfahren wiederholen.</p>

Problem	Mögliche Ursache	Untersuchung/Maßnahmen
Alle Kavitäten negativ	<p>4. Kit falsch gelagert.</p> <p>5. Waschpuffer wurde mit Stopplösung anstelle von Waschpufferkonzentrat angesetzt.</p>	<p>▶ Das Kit bei muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. Überprüfen, ob die Platte versiegelt und der Beutel mit dem Trockenmittel blauviolett ist.</p> <p>▶ Waschpuffer immer richtig ansetzen.</p>



**BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA /  
BIBLIOGRAFIA / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA**

1. Snyder, L., Dohal, M., Norris, M., Symonds, M. and Scott, J. (1997).  
Review of leptospirosis notifications in Queensland 1985 to 1996.  
*CD/21*, 17–20.
2. Turner, L.H. (1968). Leptospirosis II Serology. *Trans. Royal. Soc.  
Trop. Med. & Hyg.* 62: 860–899.
3. Bennenson, A. (Ed). (1995) *Control of Communicable Diseases  
Associations (16<sup>th</sup> edn.)* The Association, Washington.
4. Winslow, W.E., Merry, D.J., Pric, M.L. and Devine, P.L. (1997).  
Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent  
assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of  
human leptospiral infection. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1938–1942.
5. Terpstra, W.J., Ughhart, G.S. and Schoone, G.J. (1985). ELISA for  
the detection of specific IgM and IgG in Human Leptospirosis. *J  
Gen. Micro.* 131:377–385.
6. Adler, B. and Faine, S. (1980). Epidemiology of human  
leptospirosis in Australia. *CD Bulletin*, 80/21,2–4.

7. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health  
Service, Centers for Disease Control and Prevention, National  
Institutes of Health. (1999), p. 9–16. In (ed.) Richmond, J.Y.  
McKinney RW, Guidelines: Biosafety in Microbiological and  
Biomedical Laboratories, 4th Edition, U.S. Government Printing  
Office, Washington, D.C.

# Panbio Leptospira IgM ELISA

Cat. No. 02PE10/02PE11

Manufactured by  
**STANDARD DIAGNOSTICS, INC.**  
65, Ebrahimpour St., Gharapour, Vazirabad, Gyeonggi-do, Republic of Korea  
Tel: 82-31-6792-2938 Email: [Panbio@standard.com](mailto:Panbio@standard.com)  
[www.panbio.com](http://www.panbio.com)



Autorizovaná zástupce/representative

**MT Promedf Consulting GmbH**

Aloisiusstrasse 80 D-46396 S.A. Paderborn, Germany  
Phone: +49 5204 54 1020 Fax: +49 5204 541071



better tests for more people

Date issued : 2015. 05  
02PE10/02PE11-06-0