

LEISHMANIA INFANTUM

Test immunoenzimatico per la diagnostica della leishmaniosi viscerale

96 tests su astine separabili destinate ad uso in vitro

Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9500
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01756



Uso previsto del prodotto :

Diagnosi sierologica (IgG) della leishmaniosi viscerale. Sorveglianza epidemiologica. Screening sistematico di pazienti infetti da HIV che hanno soggiornato in zone endemiche. Follow up post-terapeutico di pazienti co-infetti HIV-Leishmania.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti sensibilizzati con antigeni di *Leishmania infantum*. La presenza di anticorpi sierici specifici rispetto agli antigeni parassitari è evidenziata mediante un coniugato proteina A-fosfatasi alcalina. I pozzetti sono suddivisi in astine separabili, che permettono di testare economicamente piccole serie di campioni.

Materiale contenuto nel kit (96 tests):

WELL	9500-01	Pozzetti sensibilizzati con gli antigeni solubili promastigoti di <i>Leishmania infantum</i> , su astine separabili	96	pozzetti
DILB	9500-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x)	50	ml
WASH	9500-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Tampone dell' enzima	50	ml
STOP	9500-05	Soluzione d'arresto (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Siero di controllo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Siero di controllo debomente positivo (soglia)	200	µl
CONTROL +	9500-08	Siero di controllo positivo	200	µl
CONJ	9500-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina	300	µl
SUBS	9500-10	Substrato della fosfatasi	20	Compresse
		Riserva di reattivi per multipipette, 25 ml	1	Pezzo
		Quadro di sostegno per il contenitore dei pozzetti	1	Quadro

Conservazione:

Conservare il kit tra 2° e 8° C (trasporto a temperatura ambiente). La data di scadenza e il numero del lotto sono stampati sul lato della scatola.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (μl e ml). Recipienti. Provette per la diluizione dei sieri. Bande adesive per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C . Lettore ELISA tarato ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9500-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti. Mettere i pozzetti in un supporto. Se necessario, completare le posizioni non utilizzate del supporto con dei pozzetti già usati. Mettere il supporto in un quadro rispettando il suo orientamento. Conservare le astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

Tampone di diluizione: diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 9500-02, 1/10 in acqua distillata.

Soluzione di lavaggio: diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 9500-03, 1/10 in acqua distillata. Se volete utilizzare la vostra soluzione di lavaggio, evitate i tamponi che contengono fosfato e che potrebbero inibire successivamente l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina.

Sieri di controllo negativi, debolmente positivi (soglia) e positivi: diluire 10 μl di ogni siero di controllo 9500-06 a -08 in 190 μl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20).

Sieri da testare: diluire 10 μl di siero in 2.0 ml della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/201).

Coniugato proteina A - fosfatasi alcalina: diluire il coniugato 9500-09, 1/51 nella soluzione tampone di diluizione.

Soluzione di substrato: equilibrare alla temperatura ambiente il tampone dell'enzima 9500-04. Prima di aggiungere ai pozzetti ELISA il substrato della fosfatasi dissolvere il numero necessario di compresse di substrato 9500-10 nel tampone dell'enzima 9500-04 non diluito (una compressa in 2.5 ml di tampone). Vortexare fino a scioglimento completo della compressa.

Soluzione d'arresto: utilizzare il reagente N° 9500-05 non diluito.



Precauzioni d'uso: Le soluzioni 9500-02, 9500-03, 9500-04 e 9500-09 contengono rispettivamente 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.1% di azoturo di sodio (NaN_3). La soluzione 9500-02 contiene 0.02% di merthiolato. Queste sostanze sono tossiche. La soluzione d'arresto 9500-05 (0.5 M K_3PO_4) è irritante.

I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (9500-06 a -08) provengono da conigli.

Volumi da preparare:

			Numero di pozzetti da utilizzare			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampone di diluizione (10 x)	9500-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. di lavaggio (10 x)	9500-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Coniugato	9500-09 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sieri di controllo	9500-06 a -08 + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sieri da testare	Siero + tampone di diluizione	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Soluzione di substrato	9500-10 + 9500-04	comp. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Metodo:

Tappa 1: Bloccaggio:

Riempire completamente i pozzetti con la soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti alla temperatura ambiente (bloccaggio dei pozzetti).

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le astine sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con i campioni di siero:

Riempire il primo pozzetto della prima astina con 100 µl di tampone di diluizione ("bianco", senza siero).

Riempire i tre pozzetti seguenti con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo).

Riempire gli altri pozzetti con i sieri da testare diluiti (100 µl)

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare i sieri e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 3: Incubazione con il coniugato:

Distribuire 100 µl del coniugato proteina A - fosfatasi diluito in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

Tappa 4: Incubazione con il substrato:

Distribuire 100 µl della soluzione di substrato in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Arrestare la reazione aggiungendo a ogni pozzetto 100 µl della soluzione d'arresto.

Tappa 5: Misura della densità ottica:

Asciugare sotto i pozzetti, eliminare le eventuali bolle d'aria e misurare la densità ottica (Assorbimento) alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del "bianco" in assenza di siero da tutti gli altri valori. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti : DO del controllo positivo >1.200, DO del controllo negativo < 15% del controllo positivo, DO del "bianco" misurato contro l'aria < 0.350.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 9500-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di leishmaniosi e i sieri di soggetti sani.

Il risultato è **negativo** quando la densità ottica del siero da testare è più bassa di quella del siero soglia 9500-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni solubili promastigoti di *Leishmania infantum* non è clinicamente significativa.

Il risultato è **positivo** quando la densità ottica del siero da testare è più alta di quella del siero soglia 9500-07. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni solubili promastigoti di *Leishmania infantum* è considerata clinicamente significativa.

Sensibilità e specificità del test:

Nei pazienti immunocompetenti affetti da leishmaniosi viscerale da *L. infantum*, la sensibilità del test è superiore al 95 %. È compresa tra 60 e 85 % nei pazienti co-infetti HIV-*Leishmania*.

In questi pazienti può essere osservata una sierologia negativa in presenza di una coltura positiva, in particolare in caso di immunodepressione o di infezione ad opera di altre specie di leishmanie come *L. major* o *L. braziliensis*.

La specificità del test è superiore al 95 % con dei sieri di donatori di sangue svizzeri. Delle reazioni crociate sono possibili con sieri di pazienti che hanno altre infezioni parassitarie e in particolare la tripanosomiasi africana, la malattia di Chagas e le leishmaniosi cutanee e muco-cutanee. Uno studio interno ha mostrato che i sieri lipemici, itterici o emolisati non presentavano problemi per la realizzazione di questo test.

La ripetibilità è stata valutata testando 2 sieri umani in 24 pozzetti di una micropiastra in un unico test. La riproducibilità è stata valutata testando questi 2 campioni in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
Media (densità ottica)	1.005	1.766	1.381	2.187
Deviazione-standard (DO)	0.061	0.086	0.097	0.114
Coefficiente di variazione (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Riferimenti bibliografici:

Badaro, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, G., Jones, T.C. (1986) Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in american visceral leishmaniasis : antigen selection for detection of infection specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 72-78.

Daleine, G., Deniau, M., Matheron, S., Leport, C., Lebras, J. (1994) Leishmaniose viscérale au cours de l'infection à VIH : avantages du sérodiagnostic par technique ELISA. *Pres. Med.* **23** : 672-673.

Nassar, N., Gangneux, J.P., Sulahian, A., Derouin, F. (1996) Leishmaniose viscérale au cours du sida : Difficultés du diagnostic sérologique, évaluation d'une nouvelle trousse ELISA. *Feuillets de Biologie.* **37**: 39-42.

Senaldi, G., Xiao-su, H., Hoessli, D.C., Bordier, C. (1996) Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by a dot-enzyme immunoassay for the detection of a *Leishmania donovani*-related circulating antigen. *Journal of Immunological Methods.* **193**: 9-15.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica.* **116**: 193-199.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

