

LEISHMANIA INFANTUM

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de leishmaniose visceral

96 ensaios em poços individuais

Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 9500
N.º reg. CE: H-CH/CA01/IVD/01756



Utilização prevista:

Diagnóstico serológico (IgG) de leishmaniose visceral. Pesquisas sero-epidemiológicas. Controlo serológico de doentes com VIH de áreas endémicas. Controlo pós-terapêutico de doentes coinfectados com VIH e leishmania.

Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) em poços de microplaca sensibilizados com antígenos de promastigotas solúveis de *Leishmania infantum*. A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

Material incluído no kit (96 ensaios):

WELL	9500-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com Antígenos solúveis de <i>Leishmania infantum</i>	96	poços
DILB	9500-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x)	50	ml
WASH	9500-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Tampão da enzima	50	ml
STOP	9500-05	Solução de paragem (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Soro de controlo negativo	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Soro fracamente positivo (cut off)	200	µl
CONTROL +	9500-08	Soro de controlo positivo	200	µl
CONJ	9500-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina	300	µl
SUBS	9500-10	Substrato de fosfatase	20	pastilhas
		Reservatório com várias pipetas, 25 ml	1	unidade
		Estrutura para suporte de 8 poços ELISA	1	unidade

Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e μ l). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

Preparação de reagentes antes da sua utilização:

Poços ELISA: abrir a parte lateral do saco de alumínio 9500-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

Tampão de diluição: diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 9500-02, 1/10 em água destilada.

Solução de lavagem: diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 9500-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

Soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10 μ l de soros de controlo 9500-06 a -08 em 190 μ l de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

Soros a testar: diluir 10 μ l de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 9500-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

Solução de substrato: pré aquecer o tampão da enzima 9500-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9500-10 em tampão não diluído 9500-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

Solução de paragem: utilizar reagente 9500-05 não diluído.



Advertências e precauções: as soluções 9500-02, 9500-03, 9500-04 e 9500-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio (NaN_3). A solução 9500-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 9500-05 (0,5 M K_3PO_4) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9500-06 a -08) são de origem canina.

Volumes a preparar:

			Quantidade total de poços a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampão de diluição (10 x)	9500-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Solução de lavagem (10 x)	9500-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9500-09 + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Soros de controlo	9500-06 a -08 + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Soros a testar	Soro + tampão de diluição	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solução de substrato	9500-10 + 9500-04	past. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedimento:

Passo 1: bloqueio:

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

Passo 2: incubação com amostras séricas:

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 3: incubação com conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

Passo 4: incubação com substrato:

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

Passo 5: medição das absorvâncias:

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 15 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo (cut off) 9500-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de leishmaniose e soros humanos saudáveis.

O resultado é **negativo** quando a absorvância da amostra analisada é inferior à absorvância do soro fracamente positivo 9500-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Leishmania* é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando a absorvância da amostra analisada é superior à absorvância do soro fracamente positivo 9500-07. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Leishmania* é considerada clinicamente significativa.

Sensibilidade e especificidade do ensaio:

A sensibilidade do teste é superior a 95% em doentes imunocompetentes que sofrem de leishmaniose visceral devido a *L. infantum*. No caso de doentes coinfectados com VIH e *Leishmania*, a sensibilidade do teste é entre 60 e 85%. Pode ocorrer uma serologia negativa e uma cultura positiva nestes doentes quando são imunossuprimidos ou infetados com outras espécies de *Leishmania* como *L. major* ou *L. braziliensis*.

A especificidade do teste é superior a 95% com soros de doadores de sangue suíços. Pode ocorrer reatividade cruzada em algumas outras infeções parasitárias como tripanossomiase africana, doença de chagas e leishmaniose cutânea e mucocutânea. A avaliação interna realizada mostrou que soros hemolisados, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

É possível testar soros de cães com este kit nas mesmas condições.

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio. A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média (absorvância)	1.005	1.766	1.381	2.187
Desvio padrão (absorvância)	0.061	0.086	0.097	0.114
Coefficiente de variação (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Referências:

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. Feuillet 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

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Tel.: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

