

LEISHMANIA INFANTUM

Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 9500

N° CE: H-CH/CA01/IVD/01756



Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de la leishmaniosis visceral. Vigilancia epidemiológica. Despistaje sistemático en pacientes HIV que hubieran transcurrido en una zona endémica. Seguimiento post.terapéutico de pacientes coinfectados HIV-Leishmania.

Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos sensibilizados con antígenos solubles de promastigotes de *Leishmania infantum*. La presencia de anticuerpos séricos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Los pocillos individuales sensibilizados, permiten de realizar pequeñas series de muestras.

Material que contiene el kit (96 pruebas):

WELL	9500-01	Pocillos sensibilizados con antígenos solubles de promastigotes de <i>Leishmania infantum</i>	96	pocillos
DILB	9500-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
WASH	9500-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
ENZB	9500-04	Tampón de la enzima	50	ml
STOP	9500-05	Solución de parada (K_3PO_4)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Suero de control negativo	200	μ l
CONTROL -/+	9500-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	μ l
CONTROL +	9500-08	Suero de control positivo	200	μ l
CONJ	9500-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	μ l
SUBS	9500-10	Substrato de la fosfatasa	20	tabletas
		Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml	1	pieza
		Cuadro para el soporte de los pocillos	1	cuadro

Conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8° C (el transporte a temperatura ambiente). La fecha de caducidad y el número de lote de producción son escritos en un costado de la caja.

Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas (μl y ml). Recipientes. Tubos para la dilución des sueros. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a 37°C . Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de 405nm .

Preparación de reactivos antes de la utilización:

Pocillos sensibilizados: Abrir el embalaje en aluminio 9500-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos. Poner los pocillos en el soporte. Si es necesario completar las posiciones no utilizadas con pocillos ya utilizados. Disponer el soporte en el cuadro respetando la orientación. Mantenga los pocillos no utilizados sellados en la bolsa con el desecante.

Tampón de dilución: diluir el tampón de dilución concentrado 10 x 9500-02, 1/10 en agua destilada.

Solución de lavado: diluir la solución de lavado concentrado 10 x 9500-03, 1/10 en agua destilada. Si usted desea utilizar su propia solución de lavado, evite tampones que contienen fosfato, lo cual podría inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.

Sueros de control negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo: diluir 10 μl de cada suero de control 9500-06 a -08 en 190 μl de tampón de dilución (dilución final: 1/20).

Sueros de pacientes: diluir 10 μl de suero en 2.0 ml de tampón de dilución (dilución final: 1/201).

Conjugado proteína A-fosfatasa alcalina: diluir el conjugado 9500-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

Solución de sustrato: equilibrar el tampón de la enzima 9500-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 9500-10 en el tampón de la enzima 9500-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto.

Solución de parada: utilizar el reactivo 9500-05 no diluido.



Precauciones de uso: Las soluciones 9500-02, 9500-03, 9500-04 y 9500-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio (Na_3N_3). La solución 9500-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 9500-05 ($0.5\text{ M K}_3\text{PO}_4$) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (9500-06 a -08) son sueros de conejo.

Volúmenes a preparar:

			Cantidad de pocillos a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampón de dilución (10 x)	9500-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	9500-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	9500-09 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	9500-06 à -08 + tampón de dilución	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sueros a analizar	suero + tampón de dilución	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Sol. de sustrato	9500-10 + 9500-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedimiento:

Etapas 1: Bloqueo:

Llenar completamente los pocillos con la solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos a temperatura ambiente (bloqueo de los pocillos).

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

Etapas 2: Incubación con las muestras de suero a analizar:

Llenar el primer pocillo de la tira con 100 µl de tampón de dilución (Blanco sin suero)

Llenar los 3 pocillos siguientes con 100 µl de sueros de controles diluidos (suero negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo).

Llenar los otros pocillos con los sueros a analizar diluidos (100 µl).

Cubrir los pocillos con un film adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con la solución de lavado.

Etapas 3: Incubación con el conjugado:

Distribuir 100 µl de conjugado proteína A-fosfatasa diluido en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con la solución de lavado.

Etapas 4: Incubación con el sustrato:

Distribuir 100 µl de la solución del sustrato en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Parar la reacción en adicionando 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.

Etapas 5: Medida de la densidad óptica:

Limpiar la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente, eliminar las burbujas de aire en caso de necesidad y proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm.

Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen: DO del control positivo >1.200, DO del control negativo <15% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero débilmente positivo (cut off) 9500-07 ha sido ajustado para permitir una distinción óptima entre los sueros de casos clínicos de leishmaniosis y los sueros de sujetos sanos.

El resultado es **negativo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es menor que la del suero cut off 9500-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de promastigotes de *Leishmania infantum* no tiene una significación clínica.

El resultado es **positivo** cuando la densidad óptica del suero a analizar es mayor que la del suero cut off 9500-07. En este caso la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra los antígenos solubles de promastigotes de *Leishmania infantum* es considerado como clínicamente significativo.

Sensibilidad y especificidad de la prueba:

En pacientes inmunocompetentes que sufren de leishmaniosis visceral por *L. infantum*, la sensibilidad de la prueba es superior al 95%. En los pacientes coinfectados HIV-Leishmania, la sensibilidad está comprendida entre 60 y 85%. Una serología negativa en presencia de un cultivo positivo puede observarse en algunos pacientes sobre todo frente a una inmunosupresión o a una infección por otras especies de leishmania como *L. major* ó *L. braziliensis*.

La especificidad de la prueba es superior a 95% con sueros de donadores suizos de sangre. Pueden existir reacciones cruzadas en sueros de pacientes afectados con otras parasitosis, particularmente la tripanosomiasis africana, la enfermedad de Chagas y las leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas. Un estudio interno ha demostrado que los sueros lipémicos, ictericos o hemolizados no representan un problema para la realización de esta prueba.

La repetitividad ha sido evaluada analizando 2 sueros humanos en 24 pocillos de una placa en una prueba única. La reproducibilidad ha sido evaluada analizando estas 2 muestras precitadas en 10 pruebas diferentes.

	Repetitividad		Reproducibilidad	
	Muestras 1	Muestras 2	Muestras 1	Muestras 2
Media (densidad óptica)	1.005	1.766	1.381	2.187
Desviación estándar (absorbance)	0.061	0.086	0.097	0.114
Coefficiente de variación (%)	6.1	4.9	7.1	5.2

Bibliografía:

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

