

Leishmania infantum IgG ELISA

Test immunoenzimatico per la diagnostica della leishmaniosi umana

96 test su pozzetti separabili destinate ad uso diagnostico in vitro e per uso professionale di laboratorio



Istruzioni d'uso per l'articolo N° 9500
N° CE: H-CH/CA01/IVD/01756 - UDI-DI: 07640158219508



Uso previsto del prodotto:

Il kit *Leishmania infantum* IgG ELISA della Bordier è finalizzato alla rilevazione quantitativa degli anticorpi IgG nei confronti della *Leishmania infantum* nel siero umano. La sierologia è un aiuto per la diagnosi e non può essere utilizzata come l'unico metodo di diagnosi.

Background:

La leishmaniosi è una malattia trasmessa da vettori flebotomi. L'infezione si verifica mediante differenti specie di protozoi intracellulari obbligati del gene *Leishmania*. L'infezione nell'essere umano è causata da circa 21 delle 30 specie conosciute che possono infettare i mammiferi. Le forme più comuni della malattia sono la leishmaniosi cutanea, che causa alterazioni della pelle e la leishmaniosi viscerale che interessa di solito la milza, il fegato ed il midollo osseo. I sintomi principali sono febbre, milza ingrossata e lesioni cutanee. La diagnosi della leishmaniosi viscerale si basa sui risultati positivi dell'esame sierologico ed un PRC positivo sugli aspirati di midollo osseo oppure su biopsie della pelle.

Principio del test e presentazione:

Il kit contiene tutto il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti fragili sensibilizzati con antigeni somatici promastigote di *Leishmania infantum*. Gli anticorpi specifici nel campione si legheranno a questi antigeni ed il lavaggio eliminerà gli anticorpi non specifici. La presenza di anticorpi specifici parassitari è rilevata mediante un coniugato di fosfatasi alcalina di proteina A. Una seconda fase di lavaggio rimuoverà il coniugato non legato. La rilevazione di anticorpi non legati viene fatta mediante l'aggiunta di substrato pNPP che diventa giallo con la presenza di fosfatasi alcalina. L'intensità del colore è proporzionale alla quantità di anticorpi specifici di *Leishmania infantum* nel campione. Viene aggiunto fosfato di potassio per fermare la reazione. L'assorbimento a nm 405 viene letto utilizzando un lettore di piastra ELISA. Il test può essere eseguito con sistemi automatici, ma ciò verrà convalidato dall'utilizzatore.

Materiale contenuto nel kit (96 test):

WELL	9500-01	Pozzetti sensibilizzati con gli antigeni somatici promastigote di <i>Leishmania infantum</i>	96	pozzetti
DILB	9500-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x) colorato porpora	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 (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	9500-06	Siero di controllo negative (20 x), involucro verde	200	µl
CONTROL -/+	9500-07	Siero di controllo debolmente positivo (soglia, 20 x), involucro giallo	200	µl
CONTROL +	9500-08	Siero di controllo positivo (20 x) involucro rosso	200	µl
CONJ	9500-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina (50x) involucro porpora	300	µl
SUBS	9500-10	Substrato della fosfatasi (para nitrofenil fosfato)	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 2-8°C (trasporto a temperatura ambiente), evitare l'esposizione per lungo periodo dei componenti alla luce diretta. La data di scadenza e il numero del lotto del kit sono stampati sul lato della scatola. Dopo l'apertura iniziale, tutti i reagenti sono stabili sino alla data di scadenza se conservati tra 2-8°C.

Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette (µl e ml). Recipienti. Provette. Nastro adesivo per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a 37°C. Lettore ELISA tarato a 405 nm. Attrezzatura automatica o manuale per il risciacquo dei pozzetti. Miscelatore a vortice. Timer.

Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente e miscelare prima dell'uso.

Pozzetti sensibilizzati: aprire il lato del sacchetto d'alluminio 9500-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti (uno in bianco, tre per i controlli, più il numero di campioni). Mettere i pozzetti sensibilizzati in un supporto a 8. 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 pozzette 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. Questo viene usato per la diluizione dei controlli, dei campioni e del coniugato. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 2-8°C.

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. La soluzione diluita per il lavaggio è stabile per 2 mesi a 2-8°C.

Sieri di controllo: diluire 10 µl di ogni siero di controllo 9500-06 a -08 in 190 µl della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20). I sieri di controllo diluiti sono stabili per 2 mesi a 2-8°C.

Coniugato: diluire il coniugato 9500-09, nella soluzione tampone di diluizione (soluzione finale 1/50). Diluire il coniugato nel giorno del test. Non conservare il coniugato diluito.

Soluzione di substrato: disciogliere delle compresse di substrato fosfatase 9500-10 nel tampone dell'enzima 9500-04 non diluito (una compressa in 2,5 ml di tampone). Sottoporre a vortice fino al completo discioglimento della compressa. Diluire il substrato il giorno del test e proteggere la provetta dalla luce diretta. Le compresse e le soluzioni substrato devono essere incolori o avere solo una lieve colorazione giallastra. Se una compressa o una soluzione substrato si colora di giallo, può essere stata parzialmente idrolizzata e deve essere scartata. Non conservare la soluzione substrato.

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

Raccolta di campioni e preparazione:

Utilizzare siero umano. Il siero deve essere conservato a 2-8°C se analizzato entro qualche giorno, altrimenti conservatelo a -20°C o di meno. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Sottoporre a vortice i campioni e diluire 1/201 in soluzione tampone diluita (ad esempio campione da 5 µl in 1,0 ml).

Avvertimenti e precauzioni:

I componenti tossici vengono rilevati nella seguente concentrazione:

Componente	Riferimento	Azoturo di sodio (Na ₂ N ₃)	Mertiolato
Tampone diluizione (10 x)	9500-02	0,1%	0,02%
Soluzione lavaggio (10 x)	9500-03	0,05%	/
Tampone enzimatico	9500-04	0,01%	/
Sieri di controllo (20 x)	9500-06 a -08	0,1%	0,02%
Coniugato (50 x)	9500-09	0,1%	/

Tutte le concentrazioni utilizzate, azoturo di sodio e il mertiolato non hanno alcun rischio tossicologico al contatto con la pelle e con le mucose.

- La soluzione d'arresto 9500-05 (0.5 M K₃PO₄) è irritante.
- I sieri di controllo negativi, debolmente positivi, positivi (da 9500-06 a -08) provengono dai cani.
- Trattare tutti i reagenti ed i campioni come materiale potenzialmente infettivo.
- Non scambiare reagenti di lotti diversi di kit ELISA della Bordier.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori con reagenti di questo kit.
- Non utilizzare reagenti dopo la loro data di scadenza.
- Chiudere le fiale di reagente subito dopo l'uso ermeticamente e non scambiare i tappi a vite per evitare la contaminazione.
- Usare pipette separate e pulite per ogni campione.
- Non riutilizzare pozzetti.
- Evitare il deterioramento dei pozzetti per azione meccanica (punte/coni, ugelli).
- Le descrizioni dei simboli utilizzati sulle etichette sono disponibili sul sito web www.bordier.ch.

Considerazioni sullo smaltimento:

Tutto il materiale utilizzato per questo test vengono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Fare riferimento alle leggi regionali e nazionali per quanto riguarda le regole e le disposizioni sui rifiuti pericolosi.

Procedura:

Durante lo svolgimento del test, evitare la formazione di bolle nei pozzetti.

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 pozzetti sopra un lavello.

Tappa 2: Incubazione con campioni:

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

Riempire i tre pozzetti seguenti rispettivamente con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo). Per test con più di 25 campioni, suggeriamo di riempire gli ultimi tre pozzetti con sieri di controllo come duplicato.

Riempire gli altri pozzetti con i sieri diluiti (100 µl ciascuno).

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 diluito in ogni pozzetto (compreso il "bianco" senza siero). Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37°C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con 250 µl di 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 entro la prima ora dopo l'aggiunta della soluzione d'arresto.

Interpretazione:

Sottrarre il valore del bianco senza siero in assenza di siero da tutti gli altri valori. Se applicabile calcolare i valori dell'assorbimento medio dei sieri di controllo duplicati. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti:

- Assorbimento (A) del controllo positivo > 1,200
- A del controllo positivo debole > 10% di A del controllo positivo
- A del controllo negativo < 8% di A del controllo positivo
- A del bianco senza siero < 0,350

I controlli di qualità dei lotti correnti vengono pubblicati sul nostro sito: www.bordier.ch.

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.

L'indice di soglia di un campione si intende da sottrazione del bianco senza siero come:

$$\text{Indice} = \frac{\text{Campione d'assorbimento}}{\text{Assorbimento siero soglia}}$$

Il risultato è **negativo** quando l'indice del campione analizzato è inferiore a **1,0**. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni di *Leishmania infantum* non è clinicamente significativa.

Il risultato è **positivo** quando l'indice del campione analizzato è superiore a **1,0**. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro degli antigeni di *Leishmania infantum* è considerata clinicamente significativa. Indica che il paziente ha avuto un contatto con il parassita.

Una zona grigia potrebbe essere intesa da ciascun laboratorio in relazione alla sua popolazione di pazienti. In caso di borderline o in caso di risultato dubbioso, suggeriamo di ripetere il test nel giro di 2-4 settimane con un campione fresco.

In caso di esito positivo o di risultato dubbioso, si consiglia di eseguire un test di conferma (il più delle volte mediante western blot) a condizione che tale test sia disponibile o richiesto dalle normative nazionali.

Prestazioni analitiche:

Specificità analitica:

È stata riscontrata una specificità del 100% in 15 sieri di pazienti con altre infezioni parassitarie. La reattività incrociata può manifestarsi in alcune altre infezioni parassitarie come la tripanosomiasi africana, la malattia di Chagas e la leishmaniosi cutanea e mucocutanea.

Non è stata osservata alcuna interferenza positiva o negativa con concentrazioni sovralfisiologiche di emoglobina, lipidi o bilirubina in sieri integrati con interferenti.

Precisione:

La ripetibilità è stata valutata testando 2 campioni di siero umano 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

Le seguenti prestazioni non possono essere valutate perché non esiste materiale di riferimento certificato per la presente analisi:

- Sensibilità analitica (limiti di rilevazione e quantificazione)
- Precisione
- Esattezza
- Campo di misura
- Linearità

Prestazioni cliniche:

Sensibilità diagnostica:

È stata riscontrata una sensibilità del 93% in 29 sieri di pazienti immunocompetenti (HIV-) affetti da leishmaniosi viscerale da *L. infantum*. È stata riscontrata una sensibilità del 67% in 21 pazienti co-infettati con siero HIV-*Leishmania*. In questi pazienti possono emergere una sierologia negativa e una coltura positiva quando sono immunosoppressi o infettati da altre specie di *Leishmania* come *L. major* o *L. braziliensis*.

Specificità diagnostica:

È stata riscontrata una specificità del 100% in 99 sieri di donatori di sangue (svizzeri).

Valore predittivo positivo e negativo:

Sono stati riscontrati un PPV del 100% e un NPV del 98% nella popolazione HIV- sopra menzionata e il 100% e il 93% nella popolazione HIV+ sopra menzionata.

Valori attesi nelle popolazioni normali e affette:

In una popolazione normale di 99 donatori di sangue svizzeri, il valore atteso dell'indice è pari a 0,39. In una popolazione colpita, in 13 sieri di pazienti affetti da leishmaniosi viscerale, il valore atteso dell'indice è 2,64.

Incidenti :

È necessario notificare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiedono l'utente e/o il paziente qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo.

Limitazioni:

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere stabilita sulla base di un singolo risultato. Una diagnosi precisa deve tenere in considerazione la situazione endemica, l'anamnesi clinica, la sintomatologia, così come le informazioni sierologiche. Nei pazienti dal sistema immunitario compromesso e nei neonati, le informazioni sierologiche sono di valore limitato.

Riferimenti bibliografici:

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. Feuilles de Biologie. 37: 39-42.

Maia, C., Nunes, M., Cristovao, J., Campino, L. (2010) Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Tropica. 116: 193-19

Lévêque, M.F., Battery, E., Delaunay, P., Lmimouni, B.E., Aoun, K., L'Ollivier, C., et al. (2020) Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis 14 : e0008139.

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

