

# LEISHMANIA INFANTUM

## Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de leishmaniose visceral humana

96 ensaios em poços individuais para utilização em diagnóstico in vitro e para laboratorial profissional

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



### Utilização prevista:

O kit ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para *Leishmania infantum* da Bordier destina-se a detetar quantitativamente anticorpos IgG contra *Leishmania infantum* em soro humano. A sorologia auxilia no diagnóstico e não pode ser utilizada como o único método de diagnóstico.

### Contexto:

A leishmaniose é uma doença propagada por vetores transmitida por mosquitos. Ocorre infeção provocada por várias espécies do protozoário intracelular obrigatório do género *Leishmania*. É provocada infeção nos humanos por cerca de 21 das 30 espécies que se sabe infetarem mamíferos. As formas de doença mais comuns são leishmaniose cutânea, que provoca distúrbios na pele, e leishmaniose visceral, que afeta normalmente o baço, o fígado e a medula óssea. Os sintomas principais são febre, baço aumentado e afeções cutâneas. O diagnóstico de leishmaniose visceral é feito com base num resultado positivo nos testes sorológicos e em PCR positiva em aspirados de medula óssea ou biópsias à pele.

### Princípio e apresentação:

O kit fornece todo o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA em poços de microplaca quebráveis sensibilizados com antígenos de promastigotas solúveis de *Leishmania infantum*. Anticorpos específicos na amostra ligar-se-ão a estes antígenos e a lavagem irá remover anticorpos não específicos. A presença de anticorpos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. Uma segunda lavagem irá remover conjugado não ligado. A revelação de anticorpos ligados é efetuada adicionando substrato pNPP, que adquire uma cor amarela na presença de fosfatase alcalina. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de anticorpos específicos de *Leishmania infantum* na amostra. É adicionado fosfato de potássio para parar a reação. A absorvância a 405 nm é lida utilizando um leitor de microplacas ELISA. O teste pode ser realizado com sistemas automáticos, mas esta situação requer validação por parte do utilizador.

### Material incluído no kit (96 ensaios):

<b>WELL</b>	9500-01	Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com antígenos de promastigotas solúveis de <i>Leishmania infantum</i>	96	poços
<b>DILB</b>	9500-02	Concentrado de tampão de diluição (10 x), cor roxa	50	ml
<b>WASH</b>	9500-03	Concentrado de tampão de lavagem (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	9500-04	Tampão da enzima	50	ml
<b>STOP</b>	9500-05	Solução de paragem (0,5 M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	9500-06	Soro de controlo negativo (20 x), tampa verde	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	9500-07	Soro de controlo fracamente positivo (cut off, 20 x), tampa amarela	200	µl
<b>CONTROL</b> +	9500-08	Soro de controlo positivo (20 x), tampa vermelha	200	µl
<b>CONJ</b>	9500-09	Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina (50 x), tampa roxa	300	µl
<b>SUBS</b>	9500-10	Substrato de fosfatase (para-nitrofenilfosfato)	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 2-8°C (transportar à temperatura ambiente), evitar exposição dos componentes a longo prazo à luz direta. A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa. Após a abertura inicial, todos os reagentes se mantêm estáveis até ao final do prazo de validade, desde que armazenados entre 2-8°C.

### **Equipamento necessário, mas não incluído no kit:**

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos de diluição. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37°C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm. Equipamento manual ou automático para lavagem de poços. Agitador tipo vórtex. Temporizador.

### **Preparação de reagentes antes da sua utilização:**

Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente e misturar antes de utilizar.

**Poços ELISA:** abrir a parte lateral do saco de alumínio 9500-01 e retirar a quantidade de poços necessários (um para solução branco, três para controlos além do número de amostras). 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. É utilizado para a diluição de controlos, amostras e conjugado. O tampão diluído mantém-se estável durante dois meses entre 2-8°C.

**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. A solução de lavagem diluída mantém-se estável durante dois meses entre 2-8°C.

**Soros de controlo:** diluir 10 µl de soros de controlo 9500-06 a -08 em 190 µl de solução tampão de diluição (dil. final 1/20). Os soros de controlo diluídos mantêm-se estável durante dois meses 2-8°C.

**Conjugado:** diluir conjugado 9500-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/50). Diluir o conjugado no dia do ensaio. Não armazenar conjugado diluído.

**Solução de substrato:** dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 9500-10 em tampão enzimático não diluído 9500-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s). Diluir substrato no dia do ensaio e proteger o tubo de luz direta. As pastilhas e as soluções de substrato devem ser incolores ou apresentar apenas uma leve tonalidade amarela. Se uma pastilha ou uma solução de substrato ficar amarela, pode ter sido parcialmente hidrolisada e deve ser eliminada. Não armazenar a solução de substrato.

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

### **Recolha e preparação de amostras:**

Utilizar soro humano. O soro deve ser armazenado entre 2-8°C se for analisado nos dias seguintes. Caso contrário, armazenar a uma temperatura igual ou inferior a -20°C. Evitar congelar e descongelar repetidamente. Agitar as amostras em vórtex e diluir 1/201 em solução tampão de diluição (por exemplo, uma amostra de 5 µl em 1,0 ml).

### **Advertências e precauções:**

Os compostos tóxicos apresentam a seguinte concentração:

Componente	Referência	Azida de sódio (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolato
Tampão de diluição (10 x)	9500-02	0,1 %	0,02 %
Solução de lavagem (10 x)	9500-03	0,05 %	/
Tampão enzimático	9500-04	0,01 %	/
Soros de controlo (20 x)	9500-06 a -08	0,1 %	0,02 %
Conjugado (50 x)	9500-09	0,1 %	/

Nas concentrações utilizadas, a azida de sódio e o mertiolato não representam qualquer risco toxicológico em contacto com a pele e as membranas mucosas.

- A solução de paragem 9500-05 (0,5 M  $K_3PO_4$ ) é irritante.
- Soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (9500-06 a -08) são de cães.
- Tratar todos os reagentes e amostras como material potencialmente infeccioso.
- Não trocar reagentes de lotes diferentes ou kits ELISA da Bordier.
- Não utilizar reagentes de outros fabricantes com reagentes deste kit.
- Não utilizar reagentes após o prazo de validade.
- Fechar bem os frascos de reagentes imediatamente após a utilização e não trocar as tampas para evitar contaminação.
- Utilizar pontas de pipetas separadas e limpas para cada amostra.
- Não reutilizar micropoços.

### **Considerações sobre eliminação:**

---

Por norma todos os materiais utilizados para este teste são considerados resíduos perigosos. Consultar as leis e regulamentos nacionais e regionais relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

### **Procedimento:**

---

Ao realizar o ensaio, evitar a formação de bolhas nos poços.

#### **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:**

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, respetivamente, 100 µl de soro de controlo negativo, fracamente positivo (cut off) e positivo. No caso de ensaios com mais de 25 amostras, recomendamos encher os últimos três poços com soros de controlo como duplicado.

Encher os restantes poços com as amostras diluídas (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 cerca de 250 µl de solução de lavagem.

#### **Passo 3: incubação com conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado diluído em cada poço (incluindo solução branco sem soro).

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

Remover o conjugado e lavar 4 x com cerca de 250 µl de 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:**

Se necessário, limpar o fundo dos poços e eliminar bolhas. Medir absorvâncias a 405 nm numa hora após a adição da solução de paragem.

### **Interpretação:**

---

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. Quando aplicável, calcular os valores médios de absorvância de controlos de soro duplicados. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios:

- absorvância (A) de controlo positivo > 1,200,
- A de controlo negativo < 10 % de A de controlo positivo,
- A de solução branco contra ar < 0,350.

Os controlos de qualidade dos lotes atuais encontram-se publicados no nosso site: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

50632\_03 9500 Por 01.2018

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 índice *cut off* de uma amostra é definido, após subtração da solução branco sem soro, da seguinte forma:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Amostra de absorvância}}{\text{Soro cut off de absorvância}}$$

O resultado é **negativo** quando o índice da amostra analisada é inferior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Leishmania infantum* é clinicamente não significativa.

O resultado é **positivo** quando o índice da amostra analisada é superior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos solúveis de *Leishmania infantum* é considerada clinicamente significativa. Indica que o doente esteve em contacto com o parasita.

Uma zona cinzenta pode ser definida por cada laboratório de acordo com a sua população de doentes. No caso de resultados-limite ou duvidosos, recomendamos repetir o teste duas a quatro semanas mais tarde com uma amostra fresca.

### Sensibilidade e especificidade:

Foi detetada uma sensibilidade de 93% com 29 soros de doentes imunocompetentes (VIH-) que sofrem de leishmaniose visceral devido a *L. infantum*. Foi detetada uma sensibilidade de 67% com 21 soros de doentes coinfectados com VIH e *Leishmania*. Pode ocorrer uma serologia negativa e uma cultura positiva nestes doentes quando são imunossuprimidos ou infectados com outras espécies de *Leishmania* como *L. major* ou *L. braziliensis*.

Foi detetada uma especificidade de 100% com 99 soros de doadores de sangue (suíços).

### Interferências:

A avaliação interna mostrou que os soros hemorrágicos, lipémicos ou ictericos não interferem com os resultados do teste.

### Precisão:

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
<b>Média (absorvância)</b>	1.005	1.766	1.381	2.187
<b>Desvio padrão (absorvância)</b>	0.061	0.086	0.097	0.114
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	6.1	4.9	7.1	5.2

### Limitações:

Foi detetada uma especificidade de 100% com 15 soros de doentes com outras infeções parasitárias. Pode ocorrer reatividade cruzada em algumas outras infeções parasitárias como tripanosomíase africana, doença de Chagas e leishmaniose cutânea e mucocutânea.

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base em resultados de um único teste. Para ser preciso, um diagnóstico deve considerar a situação endémica, o histórico clínico, a sintomatologia, imagiologia e dados serológicos.

Em doentes e recém-nascidos imunocomprometidos, os dados sorológicos têm valor limitado.

### Referências:

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.

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

