

LEISHMANIA

Western blot IgG



Analisi immunoblot per uso
diagnostico *in vitro*



#LES-WB24G : 24 test

#LES-WB12G : 12 test

#LES-WB96G : 96 test

ISTRUZIONI PER L'USO

Destinazione d'uso

LEISHMANIA Western Blot (WB) IgG è un test qualitativo per la diagnosi delle IgG sieriche con analisi Immunoblot della leishmaniosi intesa come analisi di conferma dei risultati positivi o dubbi ottenuti con le classiche analisi di screening.

Principio del test

La tecnica Western Blot: gli antigeni (promastigoti di *Leishmania Infantum*), dopo l'isolamento mediante elettroforesi, con l'esecuzione dell'elettroblot si legano alla superficie della membrana di nitrocellulosa (denominata transfer) suddivisi in 24 strisce numerate da 1 a 24.

Principio del test: Ciascun campione di siero da analizzare viene incubato separatamente con una striscia. Gli anticorpi anti-*Leishmania*, potenzialmente presenti nel campione, si legano in modo selettivo agli antigeni della *L. infantum*. Le IgG umane coniugate a fosfatasi alcalina si legano agli anticorpi anti-*Leishmania*. Gli immunocomplessi formati reagiscono con il substrato. Gli antigeni riconosciuti dagli anticorpi anti-*Leishmania* di classe IgG presenti nel campione appaiono come strisce trasversali di colore viola.

Reagenti forniti con il kit

Corsivo: confezione da 12 test (#LES-WB12G) - **Grassetto:** Confezione da 96 test (#LES-WB96G).

Cod.	Q.tà	Descrizione	Composizione
R1	1	Confezione da 24 (12, 4x24) STRISCE: standard pretagliate + colorate. (Ogni cartella e ogni adesivo sono identificati da un numero di serie univoco)	Nitrocellulosa sensibilizzata. Peso molecolare colorati (kDa): blu: 250, blu: 150, blu: 100, rosa: 75, blu: 50, verde: 37, rosa: 25, blu: 20, blu: 15, giallo: 10.
R2	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di BUFFER DILUENTE SIERI (pronto all'uso, soluzione rosa).	Buffer + tensioattivo + NaN ₃ (<0,1%).
R3	1	Fiala/e da 30 (30, 2x60) ml di CONIUGATO ANTI IgG (pronto all'uso, soluzione blu).	Buffer + sieri policlonali di capra con anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizzatori.
R5	1	Fiala da 30 (30, 125) ml di SUBSTRATO (pronto all'uso, fiala marrone opaca).	Buffer + NBT + BCIP + stabilizzatori.
R6	1	Fiala da 60 (60, 250) ml di 10 SOLUZIONE DI LAVAGGIO CONCENTRATA (da diluire in 10 parti di acqua distillata; soluzione incolore).	Buffer + tensioattivo + NaN ₃ (<0,1%).
R10	1	Provetta da 200 (200, 2x200) µl di SIERO DI CONTROLLO POSITIVO (pronto all'uso; cappuccio rosso).	Buffer + serie di sieri umani positivi per sierologia <i>Leishmania</i> + NaN ₃ (<0,1%) + stabilizzatori.

R2, R3, R5 e R6 sono uguali per tutti i kit e hanno un unico numero di lotto che dipende esclusivamente dalla data di produzione. Si raccomanda di eseguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

Altro materiale richiesto non incluso nella fornitura

- Vassoi di incubazione multi-canale in polipropilene per miniblott (#WBPP-08 o equivalenti).
- Piattaforma oscillante per immunoblot, sistema di aspirazione per liquidi (le vaschette #WBPP-08 da noi fornite possono essere svuotate semplicemente capovolgendole).
- Provette e materiale per il prelievo dei campioni, cilindri graduati, contenitori adatti. Pipette automatiche, micropipette e punte usa e getta (25 µl, 1,2 ml e 2 ml di volume).
- Acqua distillata o deionizzata. Carta assorbente (es. carta da filtro Whatman), nastro adesivo trasparente.
- Guanti in lattice, pinzette per maneggiare le strisce, cutter o bisturi, righello piatto trasparente.

Nota: I nostri reagenti possono essere utilizzati in un preparatore immunoblot automatico. **Prestare attenzione alle possibili contaminazioni chimiche dei nostri reagenti se il preparatore viene anche usato con reagenti di altro produttore** (per es. è nota la contaminazione da TWEEN 20), e alle contaminazioni batteriche. Tenere scorte di fiale per il preparatore. Dopo l'uso, non riporre i residui di reagente nelle fiale originali.

Conservazione e stabilità

Conservare tra 2 e 8 °C. I reagenti contenuti nel kit sono stabili sino alla data di scadenza indicata sulla

scatola esterna e sulle etichette delle fiale. Il buffer di detergente diluito a 1/10 è stabile per due mesi a temperature comprese fra +2 e +8 °C e per una settimana a temperatura ambiente.

Precauzioni d'uso

Sicurezza

- Solamente per uso *in vitro*. Maneggiare secondo le Buone pratiche di laboratorio (BPL) e considerare ogni reagente e ogni campione come potenzialmente tossici e/o infettivi.
- Indossare il camice, guanti e occhiali da laboratorio; non bere, mangiare o fumare all'interno del laboratorio. Non mettere in bocca le pipette.
- Il controllo positivo è un siero di origine umana che alle analisi è risultato negativo agli anticorpi dell'HIV1 e 2 e agli anticorpi dell'HCV, oltre che all'antigene dell'epatite B. Deve comunque essere maneggiato come un prodotto potenzialmente infettivo.
- Il substrato contiene una miscela di NBT e BCIP, tossica al tatto (per pelle e mucose) e per inalazione.
- I reagenti contengono sodio azide, che può generare sali metallici esplosivi a contatto con piombo e rame. Sciacquare ogni residuo con acqua.
- Smaltire i materiali di scarto (campionature, beccucci, provette, liquido detergente, reagente usato...) secondo le buone pratiche previste dal settore e dalle normative nazionali attualmente in vigore.

Precauzioni

- Non utilizzare insieme reagenti provenienti da lotti diversi.
- Usare le strisce in ordine numerico. Non mescolare strisce provenienti da lotti con numeri di serie diversi; usare le etichette in sequenza progressiva. Programmare un piano di distribuzione specifico prima di iniziare il test.
- Non toccare le strisce con le dita; usare le pinzette.
- I reagenti devono essere miscelati bene prima dell'uso, soprattutto il buffer di detergente concentrato.
- Chiudere le fiale dopo l'uso; non usare i reagenti se accidentalmente contaminati da un'altra sostanza. Non usare il reagente contenuto in una fiala che presenta segni di perdite. Non usare la soluzione se appare torbida o sedimentata.
- Per le pipette usare solamente punte usa e getta. Evitare qualunque contaminazione tra i vari canali. Verificare l'eventuale formazione di schiuma o bolle all'interno delle punte delle pipette (contaminazione batterica delle fiale di reagente).
- I vassoi di incubazione devono essere lavati solamente con acqua pulita seguita da acqua distillata (non usare mai detersivi o candeggianti).
- L'omissione di un campione o la distribuzione di volume inadeguato può rendere negativo il risultato del test, indipendentemente dalle condizioni specifiche.

Raccolta dei campioni

Raccogliere i campioni in modo asettico all'interno di provette asciutte. La quantità minima richiesta è di 25 µl di siero.

Conservare i campioni a temperatura di 2-8 °C fino al momento dell'utilizzo. Nel caso sia necessaria la refrigerazione, congelare i campioni a temperatura di -20 ± 5 °C. Non utilizzare i campioni contaminati. Evitare di congelare e scongelare i campioni più volte.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di Lavaggio: Per 4 test: in una bottiglia pulita, diluire 10 ml di detergente concentrato 10X (R6) in 90 ml di acqua distillata o deionizzata.

Come si esegue il test

N.B.: Si raccomanda di seguire sequenze a parametri multipli (vedere la gamma immunoblot LDBIO) per limitare il numero di fiale aperte e assicurare un miglior controllo qualità.

1. Programmare un piano di distribuzione dei campioni e del controllo positivo a C+ (R10).
Solamente usando questo controllo il test è tecnicamente valido ed è possibile identificare, per un determinato numero di serie, le strisce generate. Una striscia C+ non può essere utilizzata per interpretare i risultati delle strisce generate da un diverso numero di serie.
2. Tagliare il numero richiesto di strisce (R1) con un bisturi e un righello trasparente piatto, pulito e asciutto, tenendo la riga blu di posizionamento sulle strisce: tenere ben ferme le strisce con il righello e tagliarle lungo il lato in cui si esercita la pressione (i numeri sono leggibili attraverso il righello).
3. Distribuire 1,2 ml di tampone di diluizione (R2) in ciascun canale secondo il piano di distribuzione stabilito.
4. Depositare, in sequenza, le strisce numerate all'interno dei canali. Far reidratare le strisce per circa 1 minuto, con il numero ben visibile in alto, agitando delicatamente il vassoio e facendole immergere completamente nel buffer.
5. Distribuire i campioni e il controllo/i positivo/i: in base al piano di distribuzione, in misura di 25 µl per canale. Agitare delicatamente il vassoio dopo ogni erogazione. Posizionare il vassoio su una piattaforma oscillante. **Mettere in incubazione per 90 min ± 5 min a 18-25 °C.**
6. Fase di lavaggio: Eliminare il contenuto dai canali usando una pipetta Pasteur o capovolgendo il vassoio di incubazione. Versare da 2 a 3 ml di soluzione di lavaggio in ciascun canale. Mettere in incubazione sulla piattaforma di agitazione per 3 min. Ripetere l'operazione due volte, quindi eliminare il contenuto dai canali. Assicurarsi che le strisce non si capovolgano durante questi passaggi.
7. Versare 1,2 ml di coniugato anti-IgG (R3) in ciascun canale. Posizionare il vassoio sulla piattaforma oscillante. **Tenere in incubazione per 60 min ± 5 min a 18-25 °C.**
8. Fase di lavaggio: ripetere la fase 6.
9. Distribuire 1,2 ml di substrato NBT/BCIP (R5) in ciascun canale. Posizionare sulla piattaforma oscillante proteggendo dalla luce diretta. **Tenere in incubazione per 60 min ± 5 min a 18-25 °C.**

Indipendentemente dal parametro, tenere sotto controllo lo sviluppo del colore. Il processo può essere interrotto se il colore di fondo della striscia si scurisce rendendo difficoltosa la lettura (la qualità delle fasi di lavaggio influisce fortemente sulla colorazione di fondo). Ricordare che asciugando le strisce schiariscono.

10. Interrompere la reazione aspirando il substrato con una pipetta di Pasteur o capovolgendo la vasca di incubazione e versando 2 ml di acqua distillata nei canali. Ripetere quest'ultimo passaggio di lavaggio ancora una volta.

11. Asciugatura delle strisce: Con i canali ancora pieni di acqua, prendere le strisce dal lato numerato con le pinzette e depositarle, con il numero visibile, su carta da filtro Whatman. Fare asciugare all'aria. Il colore delle strisce si schiarisce naturalmente durante l'asciugatura. L'interpretazione deve essere eseguita dopo la completa asciugatura.
12. Conservazione: Trasferire le strisce su un foglio di carta, che servirà per archivarle. Allineare le righe di posizionamento. Tenendole ferme con il righello piatto, fermare le strisce sulla sommità con del nastro adesivo trasparente.

Per una buona interpretazione, le strisce devono essere ordinate per etichetta adesiva in sequenza numerica, distanziate tra loro alcuni millimetri al massimo. Non è affidabile effettuare il confronto di strisce molto distanziate tra loro (es. la striscia n. 2 con la n. 15). **È pericoloso** (falsi risultati) effettuare il confronto di strisce provenienti da confezioni diverse (strisce con numeri di serie diversi).

Controllo qualità e interpretazione

Il controllo del siero (R10) fornito nella confezione deve essere sistematicamente incluso in qualsiasi serie di immunoblot. Mostra il profilo di riferimento e garantisce tecnicamente la riuscita del test (le bande devono apparire in modo evidente sulla striscia) e la calibrazione precisa della posizione e dell'aspetto delle bande specifiche, consentendo l'interpretazione dei risultati delle strisce provenienti dallo stesso adesivo (con lo stesso numero di serie).

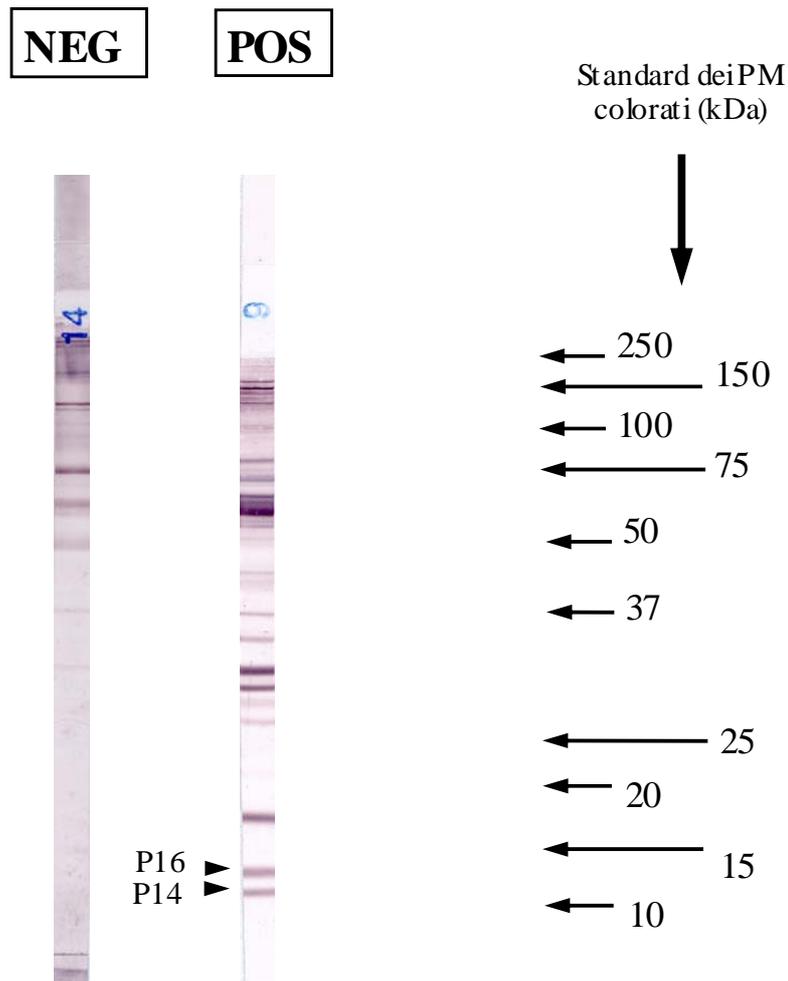


Fig. 1: Esempi di risultato positivo e negativo

- **Descrizione delle bande colorate:**

Un campione positivo può presentare molte bande tra 8 e 200k kilo-Dalton (kDa). Alcune sono specifiche della leishmaniosi [9]. La difficoltà a localizzarle tra le altre bande la cui specificità non è certa rappresenta tuttavia un limite al loro sfruttamento.

Ricercare la presenza di bande da 14 e 16 kDa per ciascuno dei campioni esaminati utilizzando gli strumenti di calibrazione sopra descritti. Tali bande posizionate nella parte inferiore della striscia, generalmente ben isolate, sono generalmente molto facili da interpretare.

- **Interpretazione:**

La presenza sulla striscia della banda dell'antigene 14 kDa e/o 16 kDa permette di interpretare il test come positivo e di concludere con la presenza di anticorpi anti-Leishmaniosi IgG nel campione di prova. (Il risultato positivo qui sopra è stato ottenuto utilizzando il controllo positivo **R10** fornito nel kit)

Per convalidare i risultati, raffrontare sempre il profilo dell'immunoblot di ogni campione con quello del controllo positivo su R10. L'aspetto delle bande colorate è importante per l'interpretazione del test.

Limitazioni d'uso

Per poter definire la diagnosi i risultati sul siero devono essere interpretati sulla base dei dati disponibili (epidemiologiche, cliniche, radiologiche, biologiche).

Un risultato negativo sierologico non esclude la diagnosi di leishmaniosi viscerale specialmente nei soggetti immunodepressi.

In caso di sospetta leishmaniosi eseguire automaticamente ricerca parassitologica del protozoo.

Prestazioni

Il test LEISHMANIA WB IgG è stato oggetto di uno studio comparativo con le tecniche IFA ed ELISA in un laboratorio indipendente.

- **Sensibilità:**

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	41	40	51
NEGATIVI	10	11	0

Tabella 1: 51 sieri di pazienti con attiva leishmaniosi viscerale evolutiva sono stati testati con 3 tecniche. ELISA e IFA hanno mostrato risultati falsi negativi soprattutto in soggetti immunodepressi (HIV).

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	0	0	15
NEGATIVI	20	20	5

Tabella 2: 20 sieri provenienti da soggetti sani che vivono in un'area endemica e con test cutaneo positivo sono stati testati in parallelo nelle tre tecniche: la sensibilità di IFA ed ELISA è insufficiente per rilevare livelli molto bassi di anticorpi.

- Specificità:

	IFA	ELISA	WB
POSITIVI	0	0	0
NEGATIVI	30	30	30

Tabella 3: 30 sieri provenienti da adulti sani che vivono in zone non endemiche sono stati testati in parallelo con immunoblot in ELISA e IFA in un laboratorio indipendente: la specificità delle tre tecniche è stata del 100%. NB: le reazioni false-positive vengono frequentemente riscontrate indipendentemente dalla tecnica nei pazienti affetti da tripanosomiasi (T. cruzi).

- Riproducibilità:

La riproducibilità all'interno delle serie e dei lotti è stata testata. In entrambi i casi, la correlazione esistente tra siero e siero rispetto alle specifiche bande colorate è eccellente.

- Interferenze:

Sebbene nessuna particolare reazione incrociata sia stata osservata con il siero emolitico, itterico o lipidico, si raccomanda di interpretare i risultati di tali campioni con cura.

Ricerca e soluzione di eventuali problematiche

“Le bande colorate sono tenui e hanno poco contrasto”: Alcuni sieri con bassa concentrazione di anticorpi possono dare risultati di questo tipo.

“Si vedono zone sfumate, più o meno colorate, appena diffuse”: La striscia non è stata completamente immersa in uno dei reagenti e non è stata incubata correttamente su tutta la lunghezza. Possono anche comparire delle macchie nel punto di appoggio del campione, se il vassoio non è stato ben agitato dopo l'erogazione.

“Il rumore di fondo è notevole e rende la lettura molto difficoltosa”: I lavaggi non sono stati sufficienti oppure l'ultima incubazione è durata troppo. Assicurarsi di seguire le giuste tecniche procedurali, rispettare i tempi di lavaggio e assicurarsi della qualità dell'acqua. Ridurre il tempo dell'ultima incubazione. Eccezionalmente, alcuni sieri reagiscono in modo anomalo. Pertanto, il risultato dell'immunoblot non è utilizzabile.

Questo rumore di fondo anomalo può interessare solamente parte della striscia, rendendo impossibile l'interpretazione di quella sola parte.

“Durante l'ultima fase di sviluppo nella soluzione compare un precipitato”: il substrato potrebbe in parte precipitare (fiocchi neri) nel buffer alla fine dello sviluppo. Questo fenomeno non altera la qualità dello sviluppo che deve proseguire normalmente. L'ultimo lavaggio con acqua distillata elimina le particelle solide eventualmente presenti.

Bibliografia

- Aoun, Olivier, Charles Mary, Cédric Roqueplo, Jean-Lou Marié, Olivier Terrier, Aurélie Levieuge, et Bernard Davoust. 2009. « Canine Leishmaniasis in South-East of France: Screening of Leishmania Infantum Antibodies (western Blotting, ELISA) and Parasitaemia Levels by PCR Quantification ». *Veterinary Parasitology* 166 (1-2): 27-31. doi:10.1016/j.vetpar.2009.08.006.
- Biglino, A., C. Bolla, E. Concialdi, A. Trisciunglio, A. Romano, et E. Ferroglio. 2010. « Asymptomatic Leishmania Infantum Infection in an Area of Northwestern Italy (Piedmont Region) Where Such Infections Are Traditionally Nonendemic ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (1): 131-36. doi:10.1128/JCM.00416-09.

- Cota, Gláucia Fernandes, Marcos Roberto de Sousa, Fábio Nogueira Demarqui, et Ana Rabello. 2012. « The Diagnostic Accuracy of Serologic and Molecular Methods for Detecting Visceral Leishmaniasis in HIV Infected Patients: Meta-Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.
- Deniau, M., C. Cañavate, F. Faraut-Gambarelli, et P. Marty. 2003. « The Biological Diagnosis of Leishmaniasis in HIV-Infected Patients ». *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 97 (Supplement-1): 115-33. doi:10.1179/000349803225002598.
- Ferroglio, E., E. Centaro, W. Mignone, et A. Trisciuglio. 2007. « Evaluation of an ELISA Rapid Device for the Serological Diagnosis of Leishmania Infantum Infection in Dog as Compared with Immunofluorescence Assay and Western Blot ». *Veterinary Parasitology* 144 (1-2): 162-66. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.017.
- Kallel, K, L Ammari, E Kaouech, S Belhadj, S Anane, B Kilani, et E Chaker. 2007. « [Asymptomatic bearing of Leishmania infantum among Tunisian HIV infected patients] ». *Pathologie-biologie* 55 (10): 521-24. doi:10.1016/j.patbio.2007.07.017.
- Lachaud, L., J. P. Dedet, P. Marty, F. Faraut, P. Buffet, J. P. Gangneux, C. Ravel, P. Bastien, et Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. 2013. « Surveillance of Leishmaniasis in France, 1999 to 2012 ». *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (29): 20534.
- Marty, P., A. Lelievre, J. F. Quaranta, A. Rahal, M. Gari-Toussaint, et Y. Le Fichoux. 1994. « Use of the Leishmanin Skin Test and Western Blot Analysis for Epidemiological Studies in Visceral Leishmaniasis Areas: Experience in a Highly Endemic Focus in Alpes-Maritimes (France) ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88 (6): 658-59.
- Marty, P., A. Lelièvre, J. F. Quaranta, I. Suffia, M. Eulalio, M. Gari-Toussaint, Y. Le Fichoux, et J. Kubar. 1995. « Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to Leishmania Infantum ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 89 (6): 690-91.
- Mary, C., D. Lamouroux, S. Dunan, et M. Quilici. 1992. « Western Blot Analysis of Antibodies to Leishmania Infantum Antigens: Potential of the 14-kD and 16-kD Antigens for Diagnosis and Epidemiologic Purposes ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47 (6): 764-71.
- Pomares, Christelle, Laura Despierres, Pascal del Giudice, Pascal Delaunay, Grégory Michel, Bernard Ferrua, et Pierre Marty. 2012. « Western Blot Analysis as an Aid for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis due to Leishmania Major ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106 (7): 452-54. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.
- Ready, Paul. 2014. « Epidemiology of Visceral Leishmaniasis ». *Clinical Epidemiology*, mai, 147. doi:10.2147/CLEP.S44267.
- Saghrouni, F, I Khammari, N Kaabia, J Bouguila, J Ben Abdeljelil, A Fathallah, F Amri, et M Ben Saïd. 2011. « Asymptomatic carriage of Leishmania in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia ». *Pathologie-biologie*, décembre. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.
- Solano-Gallego, Laia, Guadalupe Miró, Alek Koutinas, Luis Cardoso, Maria Grazia Pennisi, Luis Ferrer, Patrick Bourdeau, Gaetano Oliva, Gad Baneth, et null The LeishVet Group. 2011. « LeishVet Guidelines for the Practical Management of Canine Leishmaniosis ». *Parasites & Vectors* 4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86.
- Van Griensven, J., E. Carrillo, R. López-Vélez, L. Lynen, et J. Moreno. 2014. « Leishmaniasis in Immunosuppressed Individuals ». *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): 286-99. doi:10.1111/1469-0691.12556.