



**AGROLABO**  
Leishmania Ab ELISA 96 wells

# Leishmania Ab ELISA 96 wells

*Kit ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-Leishmania infantum nel siero o plasma di cane*

## PRINCIPIO DEL TEST

Questo test è basato sulla tecnica immunoenzimatica ELISA indiretta.

L'antigene di Leishmania è adeso ai pozzetti della piastra. In ciascun pozzetto si distribuiscono i campioni da analizzare.

Se il campione in esame contiene specifici anticorpi anti-Leishmania, questi anticorpi si legheranno all'antigene adeso ai pozzetti formando il complesso Ag-Ab. Dopo il lavaggio, al fine di eliminare tutto il materiale non legato, gli anticorpi anti-Leishmania presenti nel campione verranno evidenziati da un anticorpo monoclonale specifico anti-IgG canine, marcato con perossidasi di rafano. Dopo un secondo lavaggio per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato, che si legherà esclusivamente al coniugato, sviluppando una reazione di colore azzurro visibile. L'aggiunta della soluzione di stop n. 3 (acido fluoridrico) permette la lettura visiva dei risultati. L'aggiunta della soluzione di stop n. 1 (acido solforico), invece, farà virare il colore dei pozzetti nel giallo (lettura spettrofotometrica).

## COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti);
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso;
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso;
- 1 flacone di coniugato - 100X;
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X;
- 1 flacone di diluente - pronto all'uso;
- 1 flacone di substrato (TMB) - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop n. 1 (acido solforico) - pronto all'uso;
- 1 flacone di soluzione di stop n. 3 (acido fluoridrico) - pronto all'uso.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI NEL KIT

Provette e tubi per la diluizione dei campioni; pipette di precisione e puntali; spettrofotometro con filtro alla lunghezza d'onda di 450 nm.

## PRECAUZIONI

1. Leggere attentamente le istruzioni.
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) prima dell'uso.
3. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit.
4. Il substrato è molto sensibile alla luce e alle contaminazioni. Non inserire il puntale direttamente nel flacone. La soluzione di stop è un acido forte diluito. Maneggiare i due reagenti con cura.
5. Non utilizzare i reagenti dopo la loro data di scadenza.
6. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso.
7. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo.
8. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione da analizzare.
9. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione.
10. Preparare i campioni secondo le istruzioni.

11. Evitare ogni contaminazione dei reagenti.
12. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C.

### LAVAGGIO DEI POZZETTI

Le operazioni di lavaggio possono essere effettuate con un lavatore automatico di piastre o con una pipetta multicanale in modo da dispensare un volume di 300 µl in ogni pozzetto. Dopo le incubazioni, le operazioni di lavaggio devono essere effettuate seguendo queste istruzioni:

- rovesciare il contenuto dei pozzetti in un apposito contenitore, con un movimento deciso al fine di evitare la contaminazione tra pozzetti adiacenti,
- dispensare 300 µl di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto,
- agitare delicatamente la piastra, evitando contaminazione tra i pozzetti vicini,
- rovesciare la piastra per svuotare i pozzetti,
- ripetere il lavaggio tante volte quante indicate nelle istruzioni del kit,
- prima dell'ultima operazione di rovesciamento della piastra, accertarsi che il reagente da utilizzare di seguito sia pronto,
- non lasciare i pozzetti asciutti più del tempo necessario per dispensare il reagente del passaggio successivo,
- dopo l'ultimo passaggio di lavaggio la piastra deve essere asciugata su un foglio di carta assorbente.

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di siero o plasma di cane.

Preparare una diluizione **1:100** di ciascun campione con il diluente.

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

#### Soluzione di lavaggio

Diluire 1 parte di soluzione di lavaggio concentrata fornita con 9 parti di acqua distillata o deionizzata (es. 100 ml di soluzione di lavaggio concentrata in 900 ml di acqua). Una volta diluita, la soluzione di lavaggio può essere conservata a +2-8°C.

#### Coniugato

Deve essere preparato immediatamente prima dell'uso. Diluire la quantità richiesta di coniugato con il diluente (**1:100**). Mescolare la soluzione prima dell'uso. Preparare solo la quantità necessaria e non riutilizzare la quantità avanzata.

### PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 100 µl di controllo positivo e 100 µl di controllo negativo in due pozzetti successivi. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl dei campioni diluiti. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogeneizzazione dei reagenti.  
**Coprire la piastra ed incubarla per 10 minuti a temperatura ambiente.**
3. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
4. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato diluito. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogeneizzazione dei reagenti.  
**Coprire la piastra ed incubarla per 10 minuti a temperatura ambiente.**

5. Lavare 4 o più volte seguendo la procedura di lavaggio.
6. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl del substrato. Agitare delicatamente la piastra per ottenere una corretta omogeneizzazione dei reagenti.  
**Coprire la piastra ed incubarla per 5 minuti a temperatura ambiente.**
7. Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di soluzione stop.  
**ATTENZIONE:** Se si desidera effettuare la lettura visiva, aggiungere la soluzione di stop n. 3 (acido fluoridrico); per effettuare la lettura spettrofotometrica, aggiungere la soluzione di stop n. 1 (acido solforico) ed eseguire la lettura alla lunghezza d'onda di 450 nm.

## LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La lettura dei risultati è differente a seconda della soluzione di stop utilizzata.

### LETTURA VISIVA - Soluzione di stop n. 3 (acido fluoridrico)

**Campioni Positivi:** si evidenzierà lo sviluppo del colore azzurro nel pozzetto con un'intensità proporzionale alla concentrazione degli anticorpi anti-Leishmania presenti nel campione.

**Campioni Negativi:** non si avrà sviluppo di colorazione.

**Campioni Dubbi:** si avrà una colorazione intermedia azzurrino chiara che indicherà una bassa concentrazione di anticorpi, sarà pertanto necessario sottoporre il cane ad una prova di sieroconversione ripetendo l'analisi a distanza di 3-4 settimane.

### LETTURA SPETTROFOTOMETRICA - Soluzione di stop n. 1 (acido solforico)

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm. Se i campioni sono stati testati in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica dell'assorbanza dei 2 pozzetti.

## Validazione del test

Il test è valido se:

OD controllo positivo  $\geq 0.8$

OD controllo negativo < cut-off negativo

## Determinazione dei valori di CUT-OFF

Considerando il valore del controllo positivo, devono essere determinati i seguenti valori:

Cut-off negativo: OD controllo positivo x 0.30

Cut-off positivo: OD controllo positivo x 0.35

## Interpretazione dei risultati

**Campioni Positivi:** campioni con OD > cut-off positivo

**Campioni Negativi:** campioni con OD < cut-off negativo

**Campioni Dubbi:** campioni con OD compresa tra i due cut-off. In questo caso si consiglia di ripetere il test dopo 3-4 settimane.

## TITOLAZIONE:

Il titolo anticorpale è rappresentato dalla diluizione più alta del campione il cui valore di assorbanza è maggiore del cut-off positivo.

# Leishmania Ab ELISA 96 wells

*Kit ELISA for the detection of specific antibodies to Leishmania infantum in canine serum or plasma samples*

## TEST PRINCIPLE

This test is performed as an indirect enzyme linked immunosorbent assay (indirect ELISA). The antigen of Leishmania is fixed on the wells of the plate. The samples to be analyzed are distributed in each well. If the sample contains specific antibodies anti-Leishmania, these antibodies will bind to the antigen adsorbed, forming the Ag-Ab complex. After washing to eliminate all non-fixed material, the presence of anti-Leishmania antibodies is detected by a specific anti-canine IgG monoclonal antibody, labelled with horseradish peroxidase (conjugate). All non-fixed material is removed by a second washing. A specific enzyme substrate is then added to the wells which causes a colour change reaction when the conjugate is present. The addition of stop solution no. 3 (fluoridric acid) allows a visual reading (blue colour), while the addition of stop solution no. 1 (sulphuric acid) allows a spectrophotometric reading (yellow colour).

## TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 wells);
- 1 dropper of positive control - ready for use;
- 1 dropper of negative control - ready for use;
- 1 dropper of conjugate - 100X;
- 1 bottle of washing solution - 10X;
- 1 bottle of diluent - ready for use;
- 1 dropper of substrate (TMB) - ready for use;
- 1 bottle containing stop solution no. 1 (sulphuric acid) - ready for use;
- 1 bottle containing stop solution no. 3 (fluoridric acid) - ready for use.

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Test tubes for sample dilutions; precision pipettes and tips; spectrophotometer at a wavelength of 450 nm.

## PRECAUTIONS

1. Read the instructions carefully.
2. Bring all reagents to room temperature (+20-25°C) prior to use.
3. Do not substitute or mix instructions or reagents from different kits or lots.
4. The substrate is very sensitive to the light and to contaminations. Do not use the tip directly in the vial. The stop solution is a diluted strong acid. Handle the two reagents with care.
5. Do not use components after expiry date.
6. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled.
7. In each utilization of the kit the positive and negative controls must be tested.
8. Use a new tip for each sample.
9. Observe each incubation time.
10. Prepare each sample according to instructions.

11. Avoid any contamination of the reagents.
12. All kit components must be stored at +2-8°C.

## WASHING STEPS

The washing steps may be carried out using an automated plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 µl in each well. After the incubation, the washing steps should be carried out according to the following instructions:

- throw out the content of the plate by vigorously turning the plate over to avoid the possible mixture of the content from one well to another,
- dispense a volume of 300 µl of wash buffer into each well,
- shake the plate gently, avoiding contamination between wells,
- turn over the plate and tap the wells vigorously to remove the wash buffer,
- repeat the process as many times as is indicated by the kit's instructions,
- prior to emptying out the plate's contents during the final washing step, ensure that the next reagent to be added to the plate is ready to use,
- the wells should not be left dry for any longer than strictly necessary in order to dispense the reagent of the following step,
- after the last washing step, blot the empty wells face down on clean paper towels or absorbent paper to remove residual wash buffer.

## PREPARATION OF SAMPLES

Canine serum or plasma samples.

Prepare a **1:100** dilution of each sample to be tested using diluent.

## PREPARATION OF REAGENTS

### Wash buffer solution:

Dilute one part of the wash buffer supplied into 9 parts of distilled or deionized water (ie. 100 ml of concentrated wash buffer with 900 ml of water). Once diluted, the wash buffer solution may be stored at +2-8°C.

### Conjugate:

To be prepared immediately prior to use. Dilute the required amount of conjugate **1:100** with the diluent. Mix the solution prior to use. Prepare only the required amount and do not reuse surplus conjugate.

## TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.
2. Add 100 µl of positive and negative controls in two different wells. Add 100 µl of diluted samples to the remainder wells of the plate. Delicately shake the plate.  
**Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.**
3. Wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.
4. Dispense 100 µl of previously prepared conjugate into each well. Delicately shake the plate.  
**Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes.**
5. Repeat the wash cycle 4 times or more according to the procedure previously described.

6. Add 100 µl of substrate to each well. Delicately shake the plate.  
**Seal the plate and incubate at room temperature for 5 minutes.**
7. Add 100 µl of stop solution to each well.

**ATTENTION:** If you need a visual reading use stop solution no. 3 (fluoridric acid).  
If you need a spectrophotometric reading add the stop solution no. 1 (sulphuric acid) and read the absorbances of each well at 450 nm.

## READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The reading of the results differs depending on the stop solution used.

### VISUAL READING – Stop solution no. 3 (fluoridric acid)

**Positive samples:** a blue colour will develop. Colour intensity is proportional to the quantity of anti-Leishmania antibodies in the sample.

**Negative samples:** no colour will develop.

**Doubtful samples:** an intermediate colour light blue will indicate a low antibodies concentration; it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks.

### SPECTROPHOTOMETRIC READING – Stop solution no. 1 (sulphuric acid)

The reading of the absorbance values (OD) must be carried out at a wavelength of 450 nm. If you run the samples or controls in duplicate wells, the OD value for the sample and controls will be the mean of both wells.

### Test Validation

The test is to be considered valid when:

OD of positive control is  $\geq 0.8$

OD of negative control < Negative Cut-off

### CUT-OFF value determination

Taking the positive value, will be determined the following cut-off:

Negative cut-off: OD positive control x 0.30

Positive cut-off: OD positive control x 0.35

### Interpretation of the results

**Positive Samples:** samples with an OD higher than the positive cut-off value.

**Negative Samples:** samples with an OD lower than the negative cut-off value.

**Doubtful Samples:** samples with an OD between both cut-offs. In these occasions, it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks.

### TITRATION:

The antibody titre is represented by the highest dilution of the sample that has an absorbance value higher than the positive cut-off.



**AGROLABO**

**Manufactured by;**  
Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories  
and Production Centre  
Diagnostic Division  
Via Masero 59  
10100 Scarmagno (TO)  
Italy  
Tel +39 0125 731111  
Fax +39 0125 731190  
E-mail [agrolabo@agrolabo.it](mailto:agrolabo@agrolabo.it)  
[www.agrolabo.it](http://www.agrolabo.it)  
[shop.agrolabo.it](http://shop.agrolabo.it)