



**AGROLABO**  
**LeishmaCHECK Ab ELISA**



# LeishmaCHECK Ab ELISA

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

## PRINCIPIO DEL TEST

Il 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 si legheranno all'antigene adeso formando il complesso Ag-Ab. Dopo una serie di lavaggi, al fine di eliminare tutto il materiale non legato, gli anticorpi anti-Leishmania presenti nel campione verranno rilevati da un anticorpo anti-IgG di cane, marcato con perossidasi di rafano (coniugato). Dopo un secondo lavaggio per eliminare tutto il materiale non legato, viene aggiunto il substrato che si legherà esclusivamente al coniugato, sviluppando una reazione colorimetrica.

## COMPONENTI DEL KIT

- 1 piastra 96 pozzetti (in strip da 8 pozzetti divisibili)
- 1 flacone di controllo positivo - pronto all'uso
- 1 flacone di controllo negativo - pronto all'uso
- 1 flacone di coniugato - pronto all'uso
- 1 flacone di soluzione di lavaggio - 10X
- 1 flacone di diluente - pronto all'uso
- 1 flacone di substrato - pronto all'uso
- 1 flacone di soluzione di stop - pronta 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 accuratamente ed attenersi alle istruzioni**
2. Non utilizzare reagenti e istruzioni di altri kit
3. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (+20-25°C) 1 ora prima dell'esecuzione del test
4. Eseguire il test a temperatura ambiente e mantenerla costante per tutta l'esecuzione
5. Non utilizzare il kit ed i reagenti dopo la data di scadenza
6. Evitare stress termici: utilizzare tutti i reagenti per il tempo strettamente necessario al test e riporli in frigorifero a +2-8°C appena possibile
7. Estrarre solo le strip necessarie all'esecuzione del test, richiudere le rimanenti non utilizzate nell'apposita busta con dissecante, sigillare e conservare a +2-8°C
8. Preparare i campioni secondo le istruzioni: se possibile, evitare l'uso di campioni lipemici ed emolizzati
9. In ogni analisi utilizzare sempre il controllo positivo e negativo
10. Miscelare i reagenti prima dell'uso
11. Rispettare i tempi di ciascuna incubazione e l'ordine di deposizione nella piastra
12. Utilizzare un puntale nuovo per ciascun campione/reagente da analizzare, evitando la contaminazione

13. Il substrato TMB è molto sensibile alla luce e alle contaminazioni. Non inserire il puntale direttamente nel flacone. Maneggiare con cura
14. La soluzione di stop è un acido forte diluito. Maneggiare con cura
15. Tutti i componenti devono essere conservati a +2-8°C
16. Non fumare, bere o mangiare nei locali adibiti all'uso

## 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 deve essere conservata a +2-8°C.

## PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Campioni di siero o plasma di cane.

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

## 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 diluita 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 nella fase successiva 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 rovesciandola su un foglio di carta assorbente

## PROCEDURA DA SEGUIRE

1. Portare a temperatura ambiente tutti i reagenti del kit 1 ora prima di eseguire l'analisi.
2. Aggiungere 100 µl di controllo positivo e 100 µl di controllo negativo in due pozzetti differenti. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl dei campioni precedentemente diluiti.  
**Agitare delicatamente, coprire ed incubare la piastra per 30 minuti a temperatura ambiente.**
3. Lavare 4 volte seguendo la procedura di lavaggio.
4. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di coniugato.  
**Agitare delicatamente, coprire ed incubare la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente.**
5. Lavare 4 volte seguendo la procedura di lavaggio.
6. Distribuire in ogni pozzetto 100 µl di substrato.  
**Coprire ed incubare la piastra per 10 minuti a temperatura ambiente al buio.**
7. Procedere con la lettura visiva o spettrofotometrica come indicato nei punti A e B:

- A. Lettura visiva:** al termine dell'incubazione del substrato, **NON AGGIUNGERE** la soluzione di stop.
- B. Lettura spettrofotometrica:** al termine dell'incubazione del substrato, **AGGIUNGERE** 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto.

## LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

### A. LETTURA VISIVA – Senza aggiungere la soluzione di stop

Al termine dell'incubazione del substrato, valutare visivamente la colorazione dei pozzetti.

Il controllo positivo deve avere un colore blu/azzurro nettamente distinguibile dal controllo negativo, che deve risultare incolore.

#### Interpretazione dei risultati

**Campioni POSITIVI:** si evidenzierà lo sviluppo del colore azzurro nel pozzetto con un'intensità proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel campione.

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

### B. LETTURA SPETTROFOTOMETRICA - Aggiungere la soluzione di stop

La lettura dei risultati deve essere effettuata alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Se i campioni sono stati condotti in duplicato deve essere calcolata la media aritmetica sia dei campioni che dei controlli.

#### **Validazione del test**

Il test è considerato valido se:

**OD controllo negativo** < 0,1

**OD controllo positivo** > 0,6

#### **Determinazione dei valori di CUT-OFF**

**Cut-off positivo** = OD controllo negativo + 0,25

**Cut-off negativo** = OD controllo negativo + 0,10

#### Interpretazione dei risultati

### SCREENING

**Campioni POSITIVI:** sono da considerare positivi i campioni il cui valore di assorbanza è superiore al valore del cut-off positivo.

**Campioni NEGATIVI:** sono da considerare negativi i campioni il cui valore di assorbanza è inferiore al valore del cut-off negativo.

**Campioni DUBBI:** i campioni con valori di assorbanza compresi tra i 2 valori di cut-off sono da considerarsi dubbi e l'analisi deve essere ripetuta dopo 3-4 settimane.

### INDICAZIONE PER TITOLAZIONE

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



# LeishmaCHECK Ab ELISA

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

## TEST PRINCIPLE

The 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 an anti-canine IgG antibody labelled with horse-radish 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 colorimetric reaction when the specific antibodies are present.

## TEST COMPONENTS

- 1 x 96 wells plate (in strip of 8 breakable wells)
- 1 dropper of positive control - ready for use
- 1 dropper of negative control - ready for use
- 1 dropper of conjugate - ready for use
- 1 bottle of washing solution - 10X
- 1 bottle of diluent - ready for use
- 1 dropper of substrate - ready for use
- 1 dropper of stop solution - ready for use

## MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

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

## PRECAUTIONS

1. **Read carefully and follow the instruction for use**
2. Do not use reagents and instructions from other kits
3. Bring all reagents to room temperature (+20-25°C) 1 hour before running the test
4. Perform the test at room temperature and keep it constant throughout the execution
5. Do not use kit and reagents after the expiration date
6. Avoid thermal stress: use all reagents for the time strictly necessary for the test and store them at +2-8°C as soon as possible
7. Take out only the strips needed to perform the test, reseal the remaining unused ones in the appropriate bag with desiccant, seal and store at +2-8°C
8. Prepare samples according to instructions: if possible, avoid using lipemic and hemolyzed samples
9. Always use the positive and negative control in each analysis
10. Mix reagents before use
11. Respect the times of each incubation and the order of deposition in the plate
12. Use a new tip for each sample/reagent to be analyzed, avoiding contamination
13. TMB substrate is very sensitive to light and contamination. Do not insert the tip directly into the vial. Handle with care

14. The stop solution is a strong dilute acid. Handle with care
15. All components should be stored at +2-8°C
16. Do not smoke, eat or drink where specimens or kit reagents are being handled

## 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 must be stored at +2-8°C.

## PREPARATION OF SAMPLES

Canine serum or plasma samples.

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

## 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 diluted 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

## TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature 1 hour before use.
2. Add 100 µl of positive and negative controls in two different wells. Add 100 µl of each dilution of the sera on the remainder wells of the plate.

**Delicately shake the plate, seal and incubate at room temperature for 30 minutes.**

3. Wash cycle 4 times according to the procedure previously described.
4. Dispense 100 µl of conjugate into each microwell.

**Delicately shake the plate, seal and incubate at room temperature for 15 minutes.**

5. Repeat the wash cycle 4 times according to the procedure previously described.
6. Add 100 µl of substrate to each well.

**Seal the plate and incubate at room temperature for 10 minutes in the dark.**

7. Proceed with visual or spectrophotometric reading as explained in points A and B:



**A. Visual reading:** at the end of the incubation with substrate, **DO NOT ADD** stop solution.

**B. Spectrophotometric reading:** at the end of the incubation with substrate, **ADD** 100 µl of stop solution.

## READING AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

### A. VISUAL READING – Without adding stop solution

At the end of the incubation with substrate, read visually, evaluating the coloration in the wells.

The positive control must be blue/light blue and clearly distinguishable from the negative control, which should be colourless.

#### Interpretation of results

**POSITIVE samples:** a blue colour will develop. Colour intensity is proportional to the quantity of antibodies present in the sample.

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

### B. SPECTROPHOTOMETRIC READING - Add stop solution

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 values for the samples or controls will be the mean of both wells.

#### Test validation

The test is to be considered valid when:

**OD negative control** < 0.1

**OD positive control** > 0.6

#### CUT-OFF value determination

**Positive cut-off** = OD negative control + 0.25

**Negative cut-off** = OD negative control + 0.10

#### Interpretation of results

### SCREENING

**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 cases, it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks.

### TITRATION INDICATION

The antibody titer is represented by the highest dilution of the sample whose absorbance value is greater than the positive cut-off.







Manufactured by  
**Agrolabo SpA**

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