



RIDASCREEN[®] Leishmania IgG
Ref. K7321



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. El ensayo RIDASCREEN® Leishmania IgG es un inmunoensayo enzimático diseñado para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Leishmania infantum* en suero humano.

El ensayo debe utilizarse con fines de confirmación en los casos en que hay sospecha de leishmaniosis.

2. Resumen y descripción del ensayo

Tras la infección por leishmania, se forman anticuerpos específicos contra el patógeno a través de la respuesta del sistema inmunitario. La utilización de métodos inmunológicos permite determinar los anticuerpos en el suero. Tanto el método de ensayo utilizado como la elección del antígeno específico para el patógeno juegan un papel importante en la validez del ensayo.

3. Principio del ensayo

Se recubre un antígeno recombinado purificado de *Leishmania infantum* en una placa de pocillos. Los anticuerpos en las muestras del paciente se unen al antígeno y se detectan durante la segunda fase de incubación mediante anticuerpos anti-humanos marcados con enzimas (el conjugado). La enzima transforma el sustrato incoloro (peróxido de urea/TMB) en un producto final de color azul. La reacción enzimática se detiene añadiendo ácido sulfúrico y el color de la mezcla cambia de azul a amarillo al mismo tiempo. La medición final se efectúa a 450 nm en un fotómetro utilizando una longitud de onda de referencia ≥ 620 nm durante 20 minutos tras añadir el reactivo de parada.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Contenido del envase (incluye reactivos suficientes para 96 ensayos)

			K7321 IgG
Plate	96 ensayos	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en portatiras; recubiertas con antígenos recombinantes de <i>Leishmania infantum</i>	X
Diluent	100 ml	Búfer de muestra, solución salina tamponada con fosfato, lista para usar	X
SeroWP	100 ml	Búfer de lavado, concentración 10 veces superior, solución salina tamponada con Tris	X
Control IgG + <i>tapa roja</i>	1,2 ml	Control positivo IgG, suero humano, listo para usar	X
Control IgG - <i>tapa incolora</i>	1,2 ml	Control negativo IgG, suero humano, listo para usar	X
Control IgG co <i>tapa azul</i>	2,5 ml	Control de corte IgG, suero humano, listo para usar	X
Conjugate <i>tapa naranja</i>	12 ml	Conjugado de anti-IgG humana, listo para usar; conjugado de anti-IgG humana con peroxidasa en solución proteica estabilizada	X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; listo para usar	X
Stop	12 ml	Reactivo de parada ácido sulfúrico 0,5 M; listo para usar	X

Detalles sobre las sustancias peligrosas conforme a las obligaciones de etiquetado. Para más detalles: Hojas de datos de seguridad (SDS) o información del producto disponibles en www.r-biopharm.com.

5. Instrucciones de almacenamiento

El kit de prueba debe almacenarse a 2-8 °C y puede utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. El búfer de lavado diluido puede utilizarse hasta 4 semanas como máximo si se conserva a 2-8 °C, o durante 5 días cuando se conserva a temperatura ambiente (20-25 °C). Una vez alcanzada la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.

La bolsa de aluminio que contiene la placa de pocillos debe abrirse sin que se rompa el precinto de seguridad. Guardar inmediatamente las tiras de pocillos que no se necesiten en la bolsa de aluminio. Debe evitarse toda contaminación de los reactivos y el substrato incoloro debe protegerse de la exposición a la luz directa.

6. Material necesario no incluido

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de ensayo
- Mezclador de vórtice
- Micropipetas para volúmenes de 10-100 µl y 100-1000 µl
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Equipo de limpieza de microplacas o pipeta multicanal
- Lector de microplacas (450 nm, longitud de onda de referencia \geq 620 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Seguir las indicaciones del manual de instrucciones del procedimiento de ensayo. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, llevar ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lavarse las manos al finalizar el procedimiento de ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos de los ensayos.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Los sueros de control del kit (control positivo, control de corte y control negativo) se han probado para los anticuerpos de VIH y VHC, así como para el antígeno de superficie de la hepatitis B, con resultados negativos. No obstante, deben tratarse como potencialmente infecciosos, igual que las muestras de pacientes y todos los demás materiales con los que entren en contacto, y deben manipularse de acuerdo con las reglas de seguridad nacionales pertinentes.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

El ensayo se desarrolló para evaluar muestras de suero humanas. Tras la recogida de la sangre, se debe separar la sangre de los coágulos sanguíneos lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras deben conservarse en frío o congeladas hasta el momento de realizar el ensayo. Deberán evitarse a toda costa los ciclos repetidos de congelación y descongelación de las muestras, así como la contaminación microbiana. El uso de muestras turbias, ictéricas, hemolíticas, lipémicas o termoinactivadas puede dar lugar a resultados falsos.

Tabla 2: Almacenamiento de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Procedimiento de ensayo

9.1. Información general

Todos los reactivos y la placa de pocillos deben alcanzar la temperatura ambiente (20-25 °C) antes su uso. Las tiras de pocillos no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no estén a temperatura ambiente. Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de su uso. Tras el uso, el kit debe volver a almacenarse inmediatamente entre 2 y 8 °C.

Tomar únicamente el volumen de reactivos que sea necesario para la ejecución del ensayo. No volver a verter los reactivos en los viales, pues puede producirse contaminación de los reactivos. No volver a verter los reactivos en los viales, pues esto puede dar lugar a la contaminación de los reactivos.

Las placas de pocillos no pueden utilizarse más de una vez. No utilizar los reactivos ni las tiras de pocillos si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

El búfer de lavado, el búfer de muestra, el reactivo de parada y el substrato no son específicos del ensayo; pueden utilizarse también para otros RIDASCREEN® ELISA para detectar anticuerpos frente a parásitos.

9.2. Preparación del búfer de lavado

Mezclar 1 parte de búfer de lavado concentrado **SeroWP** con 9 partes de agua destilada. Para ello, añadir 100 ml de concentrado a una probeta de 1000 ml y obtener la solución diluyendo hasta 1000 ml con agua destilada. Todo cristal presente en el concentrado debe disolverse previamente calentando al baño maría a 37 °C. El búfer diluido se puede utilizar durante un máximo de 4 semanas en el supuesto de que se haya almacenado a 2-8 °C, o bien durante 5 días si se ha almacenado a temperatura ambiente (20-25 °C).

9.3. Preparación de las muestras

Diluir en proporción 1:50 las muestras de suero para el ensayo con el búfer de muestra **Diluent** antes de iniciar el ensayo.

Por ejemplo, 10 µl de suero + 490 µl de diluyente

Nota:

El control negativo, el control de corte y el control positivo están listos para su uso y NO deben diluirse.

9.4. Primera incubación

Después de insertar un número suficiente de pocillos en el soporte, pipetear 100 µl de los sueros diluidos y los controles negativo **Control IgG -**, de corte **Control IgG | co** y positivo **Control IgG +** listos para usar en los correspondientes pocillos, e incubarlos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos. Recomendamos efectuar por duplicado el control de corte **Control | co**.

9.5. Lavado

Los pocillos se deben vaciar en un recipiente de residuos que contenga solución de hipoclorito para su desinfección. Acto seguido, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa 5 veces con 300 µl de búfer de lavado cada vez. Después de cada lavado, golpear los pocillos sobre una parte no utilizada del papel absorbente para verificar que estén completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas, asegurarse de que la máquina esté ajustada correctamente al tipo de placa utilizado. Tras el lavado, dar golpecitos a la placa boca abajo sobre papel absorbente limpio para eliminar todo residuo de líquido.

9.6. Segunda incubación

Añadir 100 µl de conjugado de anti-IgG humana **Conjugate** a cada pocillo. A continuación, incubar la placa a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos.

9.7. Lavado

Lavar 5 veces conforme a la sección 9.5.

9.8. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **SeroSC** en cada pocillo. A continuación, incubar la placa a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 15 minutos. A continuación, detener la

reacción añadiendo 50 µl de reactivo de parada **Stop** y realizar la medición a 450/620 nm durante 20 minutos.

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o deterioro

A efectos de control de calidad, deben utilizarse los controles negativo, de corte y positivo cada vez que se efectúe el ensayo. El control de corte debe utilizarse por duplicado y, si las dos mediciones individuales se desvían del promedio en más del 25%, deberá repetirse el ensayo. El ensayo se ha realizado correctamente cuando las extinciones promedio de los controles cumplen los siguientes criterios:

Tabla 3: Criterios para control de calidad

	DO
Control negativo	< 0,15
Control de corte	0,2-0,5
Control positivo	≥ índice 20

Si los valores difieren de los requeridos, si el sustrato está turbio o se ha puesto azul antes de añadirlo a los pocillos, puede que los reactivos hayan caducado. Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
 - Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
 - Ejecución correcta del ensayo
 - Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas.
- No utilizar soluciones de sustrato que se hayan puesto de color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del índice de la muestra

1. La absorbancia promedio se calcula para el control de corte.
2. El índice de la muestra se obtiene dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor de corte.

Por ejemplo: Control de corte 1 DO = 0,44
 Control de corte 2 DO = 0,42
 Muestra DO = 1,591

$$\text{Valor medio del control de corte} = \frac{DO \text{ valor-de corte } 1 + DO \text{ valor de corte } 2}{2} = \frac{0,44+0,42}{2} = 0,43$$

$$\text{Índice de la muestra} = \left(\frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ valor medio del control de corte}} \right) * 10 = \left(\frac{1,591}{0,43} \right) * 10 = 37$$

11.2. Resultado del ensayo

Tabla 4: Evaluación del índice de la muestra

	negativo	ambiguo	positivo
Índice de la muestra	< 9	9-11	> 11

12. Limitaciones del método

El inmunoensayo enzimático RIDASCREEN® Leishmania IgG determina anticuerpos IgG específicos contra *Leishmania infantum* y debe realizarse si hay sospecha de leishmaniosis. Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico y otros hallazgos diagnósticos.

Las señales para detectar anticuerpos dependen de la localización de la parasitosis y pueden variar de un paciente a otro.

Es posible que aparezcan resultados ambiguos y positivos débiles en los siguientes casos:

- personas que han sufrido la picadura de flebótomos infectados (jejenes) en regiones donde la enfermedad es endémica y producen bajos títulos de anticuerpos sin manifestación de la infección
- personas que se recuperaron o se acaban de recuperar de una infección asintomática, de forma que siguen produciendo bajos títulos de anticuerpos
- personas que han padecido la enfermedad en el pasado y siguen produciendo títulos residuales
- personas en las fases tempranas de la enfermedad
- factores que son no identificables y no específicos

Estos casos deben volver a examinarse analizando otra muestra, considerando los síntomas clínicos y mediante cualquier otro método diagnóstico. En ausencia de cualquier otro diagnóstico exacto, el ensayo debe repetirse pasadas de dos a cuatro semanas con una nueva muestra.

Las personas que han padecido la enfermedad aguda o acaban de padecer recientemente la enfermedad pueden producir resultados medios y positivos altos. Es posible producir altos títulos de anticuerpos incluso tras infecciones prolongadas que han sucedido en el pasado. En aquellos casos que no estén claros, el resultado debe interpretarse considerando el historial, los síntomas clínicos y otros métodos de diagnóstico.

Un resultado negativo no descarta necesariamente la leishmaniosis. Durante las primeras etapas de la infección, el número de anticuerpos puede ser todavía tan reducido que se obtenga un resultado negativo en el ensayo. Si hay sospecha de leishmaniosis a partir del historial, debe analizarse otra muestra de suero pasadas cuatro semanas.

Se ha observado reacción cruzada con sueros que contenían anticuerpos contra *T. cruzi* (enfermedad de Chagas) en algunos casos en América del Sur. Esto debe tenerse en cuenta cuando se realice el ensayo en zonas de América del Sur donde la enfermedad de Chagas sea endémica.

Un resultado positivo no permite descartar la presencia de otro patógeno infeccioso.

13. Características de rendimiento

Tabla 5: Variación interensayo (n = 30)

Variación interensayo	IgG	
	Índice	CV
Suero 1	44,7	5,8 %
Suero 2	15,4	9,6 %
Suero 3	13,1	8,3 %
Suero 4	0,6	n/d

Tabla 6: Variación intraensayo (n = 23)

Variación intraensayo	IgG	
	Índice	CV
Suero 1	39,1	3,0 %
Suero 2	15,7	3,6 %
Suero 3	12,3	2,0 %
Suero 4	0,2	n/d

Tabla 7: Sensibilidad y especificidad en comparación con otros tres ELISA disponibles en el mercado

	IgG
Sensibilidad	100 %
Especificidad	100 %

Tabla 8: Resultados del ensayo con sueros de 200 donantes de sangre tomados de un centro de donación en Alemania










Sueros de 200 donantes de sangre	IgG
negativo	100 %
ambiguo	0 %
positivo	0 %

14. Historial de versiones


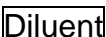

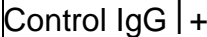
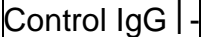
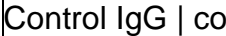
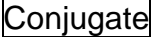
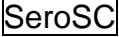

Número de versión	Capítulo y designación
15/12/2017	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico in vitro
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de lote
	Caducidad
	Temperatura de almacenaje
	Número de producto
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

	Placa de microtitulación
	Búfer de muestra
	Búfer de lavado 10x
	Control positivo de IgG
	Control negativo de IgG
	Control de corte de IgG
	Conjugado de anti-IgG humana
	Substrato TMB
	Reactivo de parada

16. Bibliografía

1. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 605-609 (1966).
2. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 490-505 (1967).
3. *Bray, R.S.*, Ecol. Dis., 4, 257-267 (1982).
4. *Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and Lanotte, G.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 213-218 (1978).
5. *Kager, P.A., Rees, P.H., Welde, B.T., Hockmeyer, W.T. and Lyerly, W.H.*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 556-559 (1981).
6. *Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 569-596 (1983).
7. *Low-A-Chee, R.M., Rose, P. and Ridley, D.S.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 255-260 (1986).
8. *Ranque, J. and Quilici, M.*, Journal of Parasitology, 56, 277-278 (1970).