

r-biopharm®



RIDASCREEN® Hantavirus Puumala IgG, IgM

REF K9221
K9231



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



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. Las pruebas de virus RIDASCREEN® Hantavirus Puumala son inmunoensayos enzimáticos para la detección cuantitativa de anticuerpos IgG o IgM contra el hantavirus Puumala en suero humano.

Estas pruebas están indicadas para su uso exclusivo en caso de sospecha de infección por hantavirus.

2. Resumen y descripción del ensayo

Taxonómicamente, los hantavirus pertenecen a la familia de los bunyavirus. Se trata de un virus ARN envuelto. El ARN se encuentra como cadena simple en tres segmentos con forma de anillo (1,2). Los hantavirus están presentes en todo el mundo. No obstante, la distribución geográfica de las diferentes especies de hantavirus depende de la presencia de serotipos específicos del huésped. Las especies Puumala y Dobrava-Belgrade, así como Hantaan residen en Europa y Asia (3). El intermediario del patógeno son roedores infectados de manera persistente y asintomática; por ejemplo, ratones que excretan grandes cantidades del patógeno a través de la orina, las heces y la saliva. Los patógenos se transmiten a los seres humanos a través de la infección por contacto o la inhalación de aerosoles que contienen heces u orina (1). Además de síntomas inocuos similares a los de la gripe, una infección con hantavirus puede causar fiebre hemorrágica con síndrome renal (nefropatía epidémica, HFRS) o afectación pulmonar (síndrome pulmonar por hantavirus, HPS). La letalidad depende principalmente de la cepa del virus y de la gravedad de la infección (4.5). La respuesta inmunitaria humoral se dirige principalmente contra el antígeno de la nucleocápside del hantavirus. Con métodos de detección sensibles, se pueden detectar anticuerpos IgM cuando aparecen los síntomas clínicos. En general, es posible detectar anticuerpos IgG dos semanas después de la infección (5).

3. Principio del ensayo

La proteína NEV-N recombinante de la especie de hantavirus Puumala se une a la superficie de los pocillos de las tiras de microtitulación. Las muestras de paciente diluidas y los controles se pipeteen en estos pocillos y se incuban a 37 °C. Los anticuerpos existentes se unen a los antígenos inmovilizados. El material libre (no unido) se elimina por lavado.

A continuación, se añade un anticuerpo antihumano (anti-IgG o anti-IgM) conjugado con peroxidasa. Todo el conjugado libre (no unido) se elimina por lavado. A continuación, se añade el sustrato (H₂O₂/TMB), que hace que aparezca un color azul en las muestras positivas debido a la enzima unida. Esta reacción termina al añadir el reactivo de parada. Esta adición hace que el color cambie de azul a amarillo. La

medición final se realiza en un fotómetro a 450 nm (longitud de onda de referencia de 620 nm) antes de 20 minutos.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones).

			K9221 IgG	K9231 IgM
Plate	96 ensayos	Placa de microtitulación; 12 tiras de microtitulación (desprendibles) en el soporte; recubiertas con antígeno de hantavirus	X	X
SeroPP Tapa transparente	110 ml	Búfer de dilución de muestras, listo para usar; solución salina amortiguada con fosfato, color amarillo	X	X
SeroWP	100 ml	Búfer de lavado, concentración 10X, solución salina amortiguada con Tris	X	X
Control IgG + Tapa verde	2,5 ml	Control estándar de IgG, listo para usar; suero humano diluido, color verde	X	
Control IgM + Tapa roja	2,5 ml	Control estándar de IgM, listo para usar; suero humano diluido, color rojo		X
Control IgG - Tapa transparente	1,2 ml	Control negativo de IgG, listo para usar; suero humano diluido	X	
Control IgM - Tapa transparente	1,2 ml	Control negativo de IgM, listo para usar; suero humano diluido		X
Control IgG A Tapa verde	1,2 ml	Control de calidad A de IgG, listo para usar; suero humano diluido, color verde	X	
Control IgG B Tapa verde	1,2 ml	Control de calidad B de IgG, listo para usar; suero humano diluido, color verde	X	
Control IgM A Tapa roja	1,2 ml	Control de calidad A de IgM, listo para usar; suero humano diluido, color rojo		X
Control IgM B Tapa roja	1,2 ml	Control de calidad B de IgM, listo para usar; suero humano diluido, color rojo		X
SeroG LD Tapa verde	12 ml	Conjugado anti-IgG humana LD (cabra), listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en solución de proteínas estabilizada	X	
SeroM LD Tapa roja	12 ml	Conjugado anti-IgM humana LD (cabra), listo para usar; anticuerpos conjugados con peroxidasa en solución de proteínas estabilizada		X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; listo para usar	X	X
Stop	12 ml	Reactivo de parada; ácido sulfúrico 1 N; listo para usar	X	X

La información sobre sustancias peligrosas cumple con los requisitos del etiquetado. Se puede encontrar más información, como hojas de datos de seguridad (SDS) e información del producto en www.r-biopharm.com.

5. Instrucciones de almacenamiento

El kit de ensayo puede utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta cuando se almacena a 2 - 8 °C. El búfer de lavado diluido tiene una vida útil de cuatro semanas cuando se almacena a 2 - 8 °C, y de una semana cuando se almacena a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.

Abrir la bolsa de aluminio que contiene la placa de microtitulación sin que se rompa el precinto de seguridad. Guardar de inmediato todas las tiras de microtitulación que no se vayan a necesitar en la bolsa de aluminio sellada a 2 - 8 °C.

Evitar la contaminación de los reactivos y proteger el sustrato incoloro de la luz directa.

6. Reactivos necesarios no suministrados

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada
- RF-Absorbens para determinaciones de IgM (como RIDA[®] RF-Absorbens, Ref. Z0202)

6.2. Accesorios

- Viales de muestras
- Incubadora a 37 °C
- Mezclador vórtex
- Micropipetas para volúmenes de 10 - 100 µl y 100 - 1000 µl
- Probeta graduada (1000 ml)
- Equipo de limpieza para placas de microtitulación o pipetas multicanal
- Fotómetro para placas de microtitulación (450 nm, filtro de referencia ≥ 620 nm)
- Papel de filtro (toallitas de laboratorio)
- Recipiente para residuos con solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Advertencias y precauciones para los usuarios

Para diagnóstico *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Deben seguirse estrictamente las instrucciones de uso para realizar este ensayo. No pipetear las muestras ni los reactivos con la boca. Evitar el contacto con heridas de la piel o membranas

mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, anteojos de protección adecuados) al manipular los reactivos y las muestras, y lavarse las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer ni beber en las zonas donde se manipulen las muestras.

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

Los usuarios son responsables de desechar de forma correcta todos los reactivos y los materiales después del uso. Se debe cumplir la normativa nacional aplicable a la hora de desecharlos.

Los sueros de control presentes en el kit (control estándar, control negativo y controles de calidad A y B) se analizaron para la detección de anticuerpos contra VIH y VHC, y el antígeno de superficie de la hepatitis B, y dieron resultados negativos. Aún así, deberían tratarse como potencialmente infecciosos, al igual que las muestras del paciente y todos los materiales que toque, y deben manipularse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales correspondientes.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Este ensayo se diseñó para el análisis de muestras de suero humano. Después de extraer la sangre, el suero debe separarse del coágulo lo antes posible para evitar la hemólisis. Las muestras deben conservarse en frío o congeladas hasta el momento de realizar el ensayo. No congelar y descongelar la muestra repetidamente, para evitar la contaminación microbiana. El uso de muestras termoinactivadas, lipémicas, hemolíticas, ictericas o turbias puede dar lugar a resultados falsos.

Tabla 2: Almacenamiento de muestras

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

9. Ejecución de la prueba

9.1. Información general

Antes de usarlos, todos los reactivos y tiras de microtitulación deben equilibrarse a la temperatura ambiente (20 - 25 °C). Una vez que hayan alcanzado la temperatura ambiente, extraer las tiras de microtitulación de la bolsa de aluminio. Mezclar bien los reactivos inmediatamente antes del uso. Después de usarlo, guardar de nuevo el kit rápidamente a 2 - 8 °C.

Utilizar solo los reactivos necesarios para realizar el ensayo. No devolver el reactivo restante al envase, ya que esto puede provocar contaminación.

Las tiras de microtitulación no pueden usarse más de una vez. No utilizar reactivos ni tiras de microtitulación si el envase está dañado o los recipientes no se han cerrado herméticamente.

Algunos reactivos del kit no son específicos del ensayo. Los reactivos identificados como Sero (como el SeroPP) se pueden usar también en otros ensayos RIDASCREEN® Sero ELISA con los reactivos correspondientes.

Los sueros de control son específicos del lote. No se permite intercambiar sueros de control entre kits que tengan diferentes números de lote.

Los controles de calidad A y B RIDASCREEN® Sero ELISA se ofrecen como muestras de control específicas adicionales en el kit de prueba RIDASCREEN® Sero ELISA correspondiente. Son muestras de control para una garantía de calidad adicional, que pueden utilizarse si se desea. Contienen suero humano de control con diferentes concentraciones de anticuerpos.

9.2. Preparación del búfer de lavado

Mezclar 1 parte de búfer de lavado concentrado [SeroWP] con 9 partes de agua destilada. Para esto, añadir 100 ml de concentrado a una probeta de 1000 ml y aforar a 1000 ml con agua destilada. Calentar previamente el concentrado (baño maría a 37 °C) para disolver los posibles cristales presentes. El búfer de lavado diluido tiene una vida útil de 4 semanas si se almacena a 2 - 8 °C y de 5 días si se almacena a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparación de la muestra

Antes de iniciar el ensayo, diluir las muestras de suero con el búfer de dilución de muestras [SeroPP]. Tener en cuenta que las diluciones son diferentes para IgG y para IgM.

IgG: dilución 1:200 de las muestras de suero

Por ejemplo: 10 µl de suero + 1990 µl de [SeroPP]

IgM: dilución 1:100 de las muestras de suero

Por ejemplo: 10 µl de suero + 990 µl de [SeroPP]

Para las determinaciones de IgM, se recomienda realizar una absorción de IgG del suero (por ejemplo, con RIDA® RF-Absorbens, Ref. Z0202) antes del ensayo.

¡Atención!

El control negativo, el control estándar y los controles de calidad A y B están listos para usarse y no se deben diluir ni absorber.

9.4. Primera incubación

Después de haber colocado un número suficiente de pocillos en el soporte, pipetear 100 µl de suero diluido y de los controles listos para usar en los pocillos respectivos; la posición A1 (valor de blanco del sustrato) permanece vacía. Añadir el control negativo o una sola vez y el control positivo o por duplicado.

Añadir los controles de calidad y o y una sola vez. La placa se incuba durante 30 minutos en una incubadora a 37 °C. La base de los pocillos no debe entrar en contacto con materiales capaces de conducir el calor fácilmente. Cubrir la placa de microtitulación durante la incubación.

Usar los controles adecuados (IgG o IgM).

A1	Valor de blanco del reactivo
B1	Control negativo
C1	Control estándar
D1	Control estándar
E1	Control de calidad A
F1	Control de calidad B
G1	Suero de paciente diluido

¡Atención!

No colocar la placa de microtitulación en un recipiente de incubación frío que se vaya a calentar hasta 37 °C durante de la incubación. El recipiente debe adaptarse previamente a 37 °C.

9.5. Lavado

Vaciar los pocillos en un recipiente para residuos que contenga una solución de hipoclorito para desinfección. A continuación, dar golpecitos a la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad residual. Después, lavar la placa 4 veces con 300 µl de búfer de lavado cada vez. Después de cada lavado, dar golpecitos a la placa sobre un área no utilizada del papel para asegurar un vaciado completo.

Cuando se utilice una máquina de lavado de microplacas, asegurarse de que esté correctamente configurada para el tipo de placa. Después del lavado, dar golpecitos a la placa sobre papel absorbente limpio para eliminar la humedad residual.

9.6. Segunda incubación

Añadir 100 µl de conjugado anti-IgG humana LD **SeroG LD** o conjugado anti-IgM humana LD **SeroM LD** a los pocillos correspondientes (incluido A1). A continuación, incubar la placa durante 30 minutos en una incubadora a 37 °C (consultar el punto 9.4).

9.7. Lavado

Lavar cuatro veces como se describe en el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **SeroSC** a cada pocillo. Después, incubar la placa durante 30 minutos en una incubadora a 37°C. Posteriormente, añadir 100 µl de solución **Stop** a cada pocillo para parar la reacción. Después de mezclar cuidadosamente la placa (dando golpecitos suaves en el borde de la placa), se mide la extinción en un fotómetro para placas a 450 nm (longitud de onda de referencia ≥ 620 nm). Llevar a cabo la medición antes de que transcurran 20 minutos después de parar la reacción. El ajuste del valor del blanco se realiza contra el valor del blanco del reactivo (posición A1).

10. Control de calidad: indicación de inestabilidad o caducidad de los reactivos

Para el control de calidad, se debe analizar el control estándar (por duplicado) y el control negativo cada vez que se lleve a cabo el ensayo. El ensayo se ha realizado correctamente si el promedio de extinción del control estándar a 450/620 nm está dentro del intervalo indicado en el certificado de calidad adjunto para ese lote concreto. Si las dos mediciones individuales se desvían más de un 20 % del promedio, se debe repetir el ensayo. El control negativo debe tener un valor de extinción $< 0,3$ a 450/620 nm.

Los controles de calidad A y B RIDASCREEN® Sero ELISA son muestras de control adicionales para garantía de calidad, que pueden utilizarse de manera opcional. El intervalo objetivo puede consultarse en el certificado de calidad adjunto específico para el lote. Los valores individuales (U/ml, UI/ml o mUI/ml) son valores de referencia para el usuario, para el aseguramiento de calidad interno del laboratorio. Una desviación de los valores esperados, así como la turbidez o coloración azul del sustrato antes de añadirlo a los pocillos, pueden ser una indicación de un reactivo caducado.

Si los valores especificados no se cumplen, comprobar lo siguiente antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Rendimiento funcional de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Ejecución correcta de la prueba
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas.
Las soluciones de sustrato de color azul ya no deben utilizarse.

Si las condiciones siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, se debe contactar con el fabricante.

11. Evaluación e interpretación

Los ensayos pueden evaluarse de tres maneras distintas:

1. Usando la curva estándar anexa
2. Usando la tabla de valores (ver la hoja de datos adjunta)
3. Matemáticamente, utilizando el método de 4 parámetros o el método α

El valor del blanco del reactivo debe restarse de todos los valores de extinción antes de la evaluación.

11.1. Evaluación mediante la curva estándar

Para una evaluación con la curva estándar, la fluctuación diaria debe corregirse obteniendo el promedio del control estándar. El factor de corrección F se calcula con el valor objetivo del control estándar y el valor del control medido en ese momento. Tener en cuenta el valor objetivo dependiente del lote, indicado en el certificado de calidad adjunto.

$$F = \frac{\text{Valor objetivo del control estándar}}{\text{Media de extinción del control estándar}}$$

Multiplicar todos los valores de DO de la muestra por el factor F. El valor U/ml correspondiente se lee de la curva estándar utilizando estos valores corregidos.

11.2. Evaluación mediante la tabla de valores

En la tabla de valores, la media de extinción del control estándar determina la columna con el intervalo de valores aplicable a la medición en curso. En esta columna, el valor de extinción de la muestra medida se asocia con el intervalo de extinción adecuado, y el título correspondiente (en U/ml) se lee en la segunda columna de la izquierda.

Por ejemplo, si el promedio de extinción del control estándar en una medición es 0,91. En este caso, se utiliza la columna de la tabla que tiene el intervalo de 0,89 a 0,94 para determinar el resultado. Entonces, una muestra de paciente con un valor de extinción de 0,61 tendrá un título dentro del intervalo de 2,01 a 35,0 unidades/ml. (Los valores anteriores son ejemplos y pueden diferir de los valores existentes en la hoja de datos).

La evaluación del resultado determinado - positivo (+), negativo (-) o en el límite (?) - se puede encontrar en la primera columna de la tabla de valores.

	U/ml	Intervalo de valores para el control estándar			
				0,89 - 0,94	
-	< 16,0			< 0,49	
?	16,0 - 20,0			0,49 - 0,56	
+	20,1 - 35,0			0,57 - 0,85	
	35,1 - 60,0			0,86 - 1,20	
	60,1 - 100,0			1,21 - 1,55	
	100,1 - 150,0			1,56 - 1,81	
	150,1 - 400,0			1,82 - 2,39	
	> 400,0			> 2,39	

Fig. 1: Ejemplo de una determinación de IgG (extraído de una hoja de datos específica del lote)

11.3. Evaluación matemática

Los valores requeridos para una evaluación matemática después de la evaluación de 4 parámetros o del método α se indican en la hoja de datos adjunta.

11.4. Evaluación e interpretación

Tabla 3: Evaluación de las unidades determinadas

	Negativo	Límite	Positivo
IgG	< 16	16 - 20	> 20
IgM	< 16	16 - 20	> 20

12. Limitaciones del método

RIDASCREEN® Hantavirus Puumala detecta anticuerpos IgG o IgM contra el hantavirus Puumala. La prueba está indicada para su uso exclusivo en casos de sospecha de infección por hantavirus. Los resultados de la prueba deben interpretarse siempre en el contexto del cuadro clínico y otros hallazgos diagnósticos. La aparición de anticuerpos puede variar de un paciente a otro en términos de tiempo y concentración. Un resultado negativo no descarta una infección por hantavirus, ya que la infección puede estar en una fase muy temprana o puede tratarse de una subespecie diferente. Si persiste la sospecha clínica, se debe repetir la prueba al cabo de unos días. Dependiendo del origen geográfico del paciente, se recomienda realizar simultáneamente una prueba de infección con una cepa distinta de hantavirus, por ejemplo, Dobrava/Hantaan. Un resultado positivo de la prueba no descarta la presencia de otros patógenos infecciosos.

13. Características de rendimiento

Tabla 5: Varianza interensayo (n = 30)

Varianza interensayo	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Suero 1	81,71	13,6 %	75,84	13,1 %
Suero 2	43,03	25,9 %	49,04	12,8 %
Suero 3	64,43	17,7 %	101,67	19,5 %
Suero 4	5,87	n/d	1,52	n/d

Tabla 6: Varianza intraensayo (n = 23)

Varianza intraensayo	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Suero 1	98,57	11,6 %	74,64	5,2 %
Suero 2	25,30	6,8 %	42,62	10,3 %
Suero 3	34,68	6,5 %	75,87	13,6 %
Suero 4	4,48	n/d	1,35	n/d

Tablas 7 y 8: Rendimiento clínico en comparación con otros ensayos de ELISA comerciales

IgG		Competidor			
		Positivo	Límite	Negativo	Total
R-Biopharm	Positivo	10	3	0	13
	Límite	2	1	0	3
	Negativo	8*	15	43	66
	Total	20	19	43	82

Coincidencia positiva: 55,6* %

Coincidencia negativa: 100 %

*La discrepancia entre los resultados (positivo con la prueba de la competencia y negativo con R-Biopharm) se verificó utilizando una prueba de referencia (LineBlot), que produjo resultados negativos.

IgM		Competidor			
		Positivo	Límite	Negativo	Total
R-Biopharm	Positivo	10	2	6	18
	Límite	0	1	6	7
	Negativo	0	3	54	57
	Total	10	6	66	82

Coincidencia positiva: 100 %

Coincidencia negativa: 90 %

Tabla 9: Resultados del análisis de 200 donantes de sangre de un centro de donación de sangre en Alemania










Sueros de 200 donantes de sangre	IgG	IgM
Negativo	99,0 %	96,5 %
Límite	0,5 %	1,0 %
Positivo	0,5 %	2,5 %

14. Historial de versiones

Número de versión	Sección y nombre
2018-02-01	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respetar las instrucciones de uso
	Número de lote
	Fecha de caducidad
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Plate	Placa de microtitulación
SeroPP	Búfer de dilución de muestras
SeroWP	Búfer de lavado 10x
Control IgG +	Control estándar de IgG
Control IgM +	Control estándar de IgM
Control IgG -	Control negativo de IgG
Control IgM -	Control negativo de IgM
Control IgG A	Control de calidad A de IgG
Control IgM A	Control de calidad A de IgM
Control IgG B	Control de calidad B de IgG
Control IgM B	Control de calidad B de IgM
SeroG LD	Conjugado de anti-IgG humana
SeroM LD	Conjugado de anti-IgM humana
SeroSC	Substrato TMB
Stop	Reactivo de parada

16. Bibliografía

1. *Ulrich R, Meisel H, Schütt M, Schmidt J, Kunz A, Klempa B, u. a.* Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz [Internet]. Juli 2004 [zitiert 23. Mai 2017];47(7). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s00103-004-0858-8>
2. *Hahn H, Kaufmann SH, Schulz TF, Suerbaum S, Adler K, Schad D, u. a.* Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag; 2009.
3. *Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O.* A global perspective on hantavirus ecology, epi-demiology, and disease. Clin Microbiol Rev. 2010;23(2):412–41.
4. *Peters MD, Simpson MD, Levy MD.* Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Annu Rev Med. 1999;50(1):531–45.
5. *Martens H.* Serologische Untersuchungen zur Prävalenz und zum Verlauf von Hantavirus-Infektionen in Mecklenburg-Vorpommern. Gesundheitswesen. 2000;62(02):71–7.