

INSTRUCCIONES DE USO

Leptospirosis IFA IgM Antibody Kit

Referencia: LEM-120

Presentación: 120 test

Almacenamiento: 2-8°C

Un inmunoensayo de fluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra *Leptospira spp.* en suero o plasma humanos

Sólo para uso en diagnóstico in vitro



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Phone: +1-714-525-7660
Fax +1-714-525-7614
Email: info@fullerlabs.com
URL: www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sarl
11, rue Émile Zola – BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 – France

USO ESPERADO

El kit Leptospirosis IFA-IgM Antibody está destinado a la detección y semi-cuantificación de anticuerpos IgM humanos contra *Leptospira spp.*, para ser usado como una ayuda en el diagnóstico de leptospirosis en humanos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La leptospirosis es una enfermedad aguda, febril y septicémica causada por espiroquetas patógenas de la especie *Leptospira interrogans*. Estos organismos se encuentran por todo el mundo en mamíferos salvajes y domésticos, contagiando a los humanos por contacto con animales infectados o indirectamente a través de orina infectada. La respuesta inmune tras la infección se puede detectar durante la primera semana de la enfermedad sintomática y la detección serológica del anticuerpo específico puede ser usada como una indicación indirecta de leptospirosis aguda.

Los portas IFA en este kit se basan en un cultivo no patógeno de leptospira que actúa como el antígeno sustrato. El suero del paciente se diluye inicialmente 1:50 en Diluyente de Muestra IgM, que contiene anticuerpos anti-IgG humanos. Este suero tratado es entonces transferido a los pocillos individuales del porta para permitir la reacción del anticuerpo del paciente con las leptospirosis. Posteriormente, los portas se lavan para eliminar el suero que no ha reaccionado y a continuación se añade un anticuerpo secundario anti-IgM humana marcado con DyLight 488 (Conjugado), para marcar los complejos antígeno-anticuerpo. Tras una última incubación, los portas se lavan de nuevo para desechar el Conjugado que no ha reaccionado. Las reacciones resultantes pueden visualizarse con microscopía de fluorescencia estándar, donde una reacción positiva es vista como leptospirosis fluorescentes de un color verde manzana claramente definido. Una reacción negativa es vista como una no fluorescencia o como una fluorescencia distinta de la observada en el pocillo del Control Positivo. Las reacciones positivas deben ser entonces retestadas a mayores diluciones para determinar el reactivo más elevado o la dilución final.

REACTIVOS

IFA Ag x 12

Portas Sustrato (10)

10 portas cubiertos, de 12 pocillos cada uno, que contienen Leptospiras (no patógenas) fijadas con acetona (Patoc I).

CONJ FITC

Conjugado IgG, 2.5 mL

Botella cuentagotas con el tapón amarillo que contiene anticuerpos de mono anti-IgM humana (cadena pesada) marcados con DyLight 488 y purificados por afinidad, albúmina de suero bovino y colorante azul de Evans.

CONT +

Control Positivo, 0.5 mL

Botella cuentagotas con el tapón azul que contiene suero pre-tratado humano a una dilución 1:50. El título final es de 1:400.

CONT -

Control Negativo, 0.5 mL

Botella cuentagotas con el tapón rojo que contiene suero pre-tratado humano a una dilución de 1:50.

IgM DIL

Diluyente de Muestra de IgM, 15 ml

Tampón que contiene anticuerpos de cabra anti-IgG humana.

MM

Medio de Montaje, 1 mL

Botella cuentagotas con el tapón blanco que contiene glicerol (50% v/v) en PBS.

BUF WASH PBS

PBS, 1 litro

Añadir el polvo que se suministra a 1 litro de agua purificada para obtener PBS (solución salina tamponada con fosfato) a un pH de 7.2.

Advertencias

El suero control ha sido testado para agentes infecciosos por la USFDA. Sin embargo, partiendo de que ninguna prueba puede asegurar la ausencia de agentes infecciosos, estos reactivos, además de todas las muestras de suero y equipamiento que se ponen en contacto con estos especímenes, deben ser manejados según unas buenas prácticas de laboratorio para evitar el contacto con la piel y su ingestión. Los portas substrato son preparados con antígenos inactivados químicamente. No obstante, éstos deben ser considerados potencialmente infecciosos y, por tanto, manipulados en consecuencia.

Almacenamiento y Manipulación

Los componentes del Kit se deben almacenar a 2-8°C. Antes de abrir las botellas o los sobres que contienen los portas, éstos deben alcanzar la temperatura ambiente (20°-25°C).

COLECCIÓN DE MUESTRAS

Permitir que las muestras de sangre coagulen y separar el suero por centrifugación. Transferir el suero asépticamente a contenedores estériles fuertemente cerrados. Almacenar a 2-8°C. Si el testaje se va a retrasar más de 5 días, se recomienda congelar la muestra a -20°C o a temperaturas inferiores. Las muestras agudas se obtienen en la aparición de la enfermedad; con muestras convalescentes obtenidas a intervalos para comprobar cambios de título.

PROCEDIMIENTO

El kit contiene suficientes reactivos y materiales para 120 determinaciones.

Materiales Requeridos Pero No Suministrados

- Agua purificada (destilada o desionizada).
- Botellas de lavado limpias de 250 o 500 mL para PBS.
- Tubos de testaje o placas de microtitulación para preparar las diluciones de suero.
- Pipeta(s) de precisión para rangos de microlitros.
- Cubreobjetos de vidrio de 24 x 50 mm.
- Microscopio de fluorescencia con un sistema de filtro para FITC (longitud de onda máxima de excitación de 490 nm, longitud de onda media de emisión de 530 nm) y un aumento de 400X.
- Baño termostático o incubador a 37°C.
- Cámara húmeda para los pasos de incubación de los portas.

Precauciones

- No usar componentes caducados.
- El Conjugado es fotosensible. Almacenar en oscuridad.
- El Conjugado contiene colorante azul de Evans, el cual puede ser cancerígeno. Evitar el contacto con la piel.
- Los reactivos líquidos contienen thimerosal al 0.01%, el cual puede ser tóxico si se ingiere.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar diluciones 1:50 del suero del paciente, como se indica a continuación: Preparar una dilución inicial 1:5 de suero en Diluyente de Muestra de IgM. Mezclar bien y dejar actuar un mínimo de 5 minutos para permitir que los agregados que se formen precipiten. Centrifugar la mezcla para eliminar los agregados y diluir el sobrenadante 1:10 en PBS para conseguir una dilución final del suero de 1:50.

PROCEDIMIENTO DEL TEST

Permitir que todos los reactivos y sueros alcancen la temperatura ambiente antes de empezar el test.

1. Los controles Positivo y Negativo se suministran a una dilución 1:50. Preparar diluciones del Control Positivo en PBS desde 1:2 hasta 1:16.
2. Para cada dilución de suero, añadir 10 µl a un pocillo del porta. En cada test, incluir en varios pocillos el Control Positivo sin diluir así como todas sus diluciones. Además, añadir 1 gota del Control Negativo a un pocillo.
3. Depositar los portas en una cámara húmeda e incubar durante 30 minutos a 37° ± 0.5°C.
4. Enjuagar los pocillos del porta con un chorro suave de PBS de la botella de lavado y, a continuación, sacudir las gotas del tampón de lavado en un contenedor de residuos. Repetir este paso de lavado 2x. Finalmente, añadir 1 gota de Conjugado.

5. Volver a colocar los portas en la cámara húmeda durante 30 minutos a 37° ± 0.5°C. La incubación se debe llevar a cabo en oscuridad para proteger el Conjugado que es fotosensible.
6. Lavar los portas como en el paso 4, añadir 2-3 gotas de Medio de Montaje a cada porta y cubrir con los cubreobjetos.
7. Leer los portas con el substrato teñido a un aumento 400X, comparando cada pocillo con la intensidad y aspecto visual de los pocillos correspondientes a los Controles Positivo y Negativo. Los portas se pueden almacenar a 2-8°C en oscuridad no más de 24 horas.

CONTROL DE CALIDAD

El suero Control Negativo y las diluciones del suero Control Positivo se deben incluir en cada test. El pocillo correspondiente al Control Negativo es un ejemplo de suero no reactivo, en donde no se distinguen leptospiras teñidas. Los pocillos de Control Positivo deben dar un título final de 1:200 a 1:800. La intensidad de fluorescencia a 1:400 debe ser usada como el nivel mínimo requerido para que una reacción se pueda considerar positiva. Si cualquiera de los Controles no reacciona como se especifica, el test se debe de considerar nulo, los diferentes reactivos y pasos del procedimiento se deberán chequear y será necesario repetir el test desde el principio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una reacción positiva aparece como una coloración brillante y uniforme (al menos 1+) de leptospiras típicas. Patrones de reactividad diferentes de los observados en el Control Positivo se deben considerar no-específicos.

La infección aguda está caracterizada por un rápido incremento en ambos tipos de anticuerpo, IgG e IgM, detectado mediante testaje por IFA. El pico máximo en los niveles de anticuerpo IgM se obtiene aproximadamente a las 3-4 semanas después del inicio de los síntomas y permanece detectable durante 2-3 meses. El pico de los anticuerpos IgG aparece a las 7-12 semanas, pero decrece más lentamente que el nivel de anticuerpos IgM, permaneciendo elevado más de 9-12 meses.

MUESTRAS DEL PACIENTE

Positivas en la dilución de ensayo: Títulos de IgM de 1:50 y superiores reflejan una infección reciente. El suero positivo debe de ser retestado para determinar el título final por comparación con muestras más tempranas o más tardías del mismo paciente.

Negativas en la dilución de ensayo: Se describen como negativas para el anticuerpo de leptospirosis.

LIMITACIONES

- Debido a la naturaleza género-específica de la respuesta IFA, la identidad del serotipo infeccioso no puede ser determinada. Se puede intentar hacer cultivos de orina en un medio apropiado para el aislamiento de leptospira.
- Tests con un título elevado de sueros procedentes de casos de la enfermedad de Lyme y sífilis sugieren la no existencia de reacciones cruzadas con otras espiroquetas patógenas en este procedimiento.
- La respuesta inmune específica a leptospirosis aguda está dominada por anticuerpos IgM. Algunos pacientes tienen una respuesta IgG más débil o retardada en comparación con la respuesta IgM.

VALORES ESPERADOS

La prevalencia de anticuerpos específicos varía dependiendo de la región geográfica y población que sean testadas. Títulos de anticuerpos específicos IgM de 1:50 y superiores son atípicos y fueron detectados en menos del 1% de los sueros cedidos a un laboratorio de análisis clínicos de referencia en California.

Revision A (3/99)