

NovaLisa[®]

Leptospira IgG

ELISA

CE

Sólo para diagnóstico in-vitro

English	2
Deutsch	7
Español	12
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía	19
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	19
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	20
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	21

Número del Producto: LEPG0660 (96 Determinaciones)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Leptospirosis (also known as Weil's syndrome) is probably the most widespread zoonosis in the world. It is caused by infection with spirochete bacteria of the genus *Leptospira* and affects humans as well as a broad spectrum of animal hosts. The incidence is significantly higher in warm climate countries than in temperate regions. The disease is seasonal, with peak incidence occurring in summer or fall in temperate regions, where temperature is the limiting factor in survival of leptospires, and during rainy seasons in warm climate regions, where rapid desiccation would otherwise prevent survival.

Natural reservoirs for the pathogenic *Leptospira interrogans* include rodents as well as a large variety of domesticated mammals (e. g. pigs, cattle and dogs). Leptospires occupy the lumen of nephritic tubules in their natural host and are shed into the urine.

Transmission can occur when humans are directly or indirectly exposed to the urine of infected animals or a urine-polluted environment. Leptospires gain entry into the human blood stream via cuts, skin abrasions or mucous membranes through contact with moist soil, vegetation, and contaminated waters; handling infected animal tissues; and ingestion of food and water. Leptospires are rarely transmitted from human to human.

The incubation period is usually 5-14 days, with a range of 2-30 days.

The spectrum of clinical symptoms is extremely wide. The vast majority of leptospiral infections are either subclinical or result in very mild illness and recover without any complications. Clinical manifestations of leptospirosis range from mild influenza-like symptoms to severe life-threatening disease forms, characterized by jaundice, renal failure, bleeding and severe pulmonary hemorrhage.

The clinical presentation of leptospirosis is biphasic, with the acute or septicemic phase lasting about a week, followed by the immune phase, characterized by antibody production and excretion of leptospires in the urine. Most of the complications of leptospirosis are associated with localization of leptospires within the tissues during the immune phase and thus occur during the second week of the illness. The classical syndrome of Weil's disease represents only the most severe presentation. It is characterized by jaundice, renal failure, hemorrhage and myocarditis with arrhythmias.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirosis	Wide spectrum of clinical symptoms: mild influenza-like symptoms to severe life-threatening disease forms	direct or indirect contact with the urine of an infected animal (via cuts, skin abrasions or mucous membranes)
	Weil's disease	jaundice, renal failure, haemorrhage and myocarditis with arrhythmias	

The presence of pathogen resp. infection may be identified by

- Pathogen detection: dark-field microscopy
culture from blood, urine, cerebrospinal fluid or tissues
PCR
- Serology: microscopic agglutination test (MAT), ELISA

2. INTENDED USE

The *Leptospira* IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Leptospira* spp. in human serum or plasma (heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against *Leptospira* spp. is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are coated with *Leptospira* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Leptospira*-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of *Leptospira*-specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Leptospira Coated Wells (IgG):** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Leptospira* antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent:** 1 bottle containing 100 ml of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; < 0.1 % MIT; < 0.1 % CMIT; < 0.1 % NaN₃.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; < 1 % Ethanol; < 0.5 % Bromonitrodioxane.
- **Leptospira anti-IgG Conjugate:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap; < 1 % Ethanol; < 0.5 % Bromonitrodioxane.

- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.04 %; ready to use; yellow cap; < 0.0001 % CMIT; < 0.0001 % MIT; < 0.01 % H₂O₂.
- **Leptospira IgG Positive Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; red cap; < 0.1 % Bromonitrodioxan; < 0.1 % MIT.
- **Leptospira IgG Cut-off Control:** 1 vial containing 3 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; green cap; < 0.1 % Bromonitrodioxan, < 0.1 % MIT.
- **Leptospira IgG Negative Control:** 1 vial containing 2 ml control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; blue cap; < 0.1 % MIT; < 0.1 % CMIT; < 0.1 % NaN₃.

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 Distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards/controls to room temperature (20...25 °C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off strips

The ready to use break-apart snap-off strips are coated with Leptospira antigen. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Solution (20x conc.)

Dilute Washing Solution 1 + 19; e. g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. Crystals in the concentrate disappear by warming up to 37 °C in a water bath.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimens should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Solution from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards/controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

- | | | |
|---------|---------------|-----------------------------|
| 1 well | (e. g. A1) | for the Substrate Blank, |
| 1 well | (e. g. B1) | for the Negative Control, |
| 2 wells | (e. g. C1+D1) | for the Cut-off Control and |
| 1 well | (e. g. E1) | for the Positive Control |

It is recommended to determine standards/controls and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µl standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100 µl Leptospira anti-IgG Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well (e. g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature.** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.**
10. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the **Substrate Blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate Blank** in A1: Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control** in B1: Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control** in E1: Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [NTU]

$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Units} = \text{NTU}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU (Units)}$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
<p>Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.</p>		

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (OD)	CV (%)
Sample #1	23	0.437	3.2
Sample #2	24	0.994	2.4
Sample #3	24	0.544	2.4
Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
Sample #1	12	21.97	8.2
Sample #2	12	13.10	3.5

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 97.4 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is > 98 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric specimen are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.5 mg/ml bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

It cannot be excluded that polyclonal B-cell activation induced by Epstein-Barr virus (EBV) or the presence of Rheumatoid Factors may result in false-positive Leptospira IgG antibody results.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.

- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.
- The concentrations of the hazardous materials mentioned in point 4.1. are very low. Therefore there is hardly any toxicological risk. Nevertheless rinse with plenty of water upon contact with eyes, skin or mucous membranes and consult a doctor in case of irritations. All solutions should be handled with adequate care.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: LEPG0660 Leptospira IgG-ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Die Leptospirose (Morbus Weil) ist weltweit die wahrscheinlich am weitesten verbreitete Zoonose. Sie wird durch Spirochäten der Gattung *Leptospira* verursacht, die sowohl den Menschen, als auch ein breites Spektrum an tierischen Wirten infizieren können. Die Leptospirose tritt in tropischen und subtropischen Ländern deutlich häufiger auf als in Regionen mit gemäßigttem Klima.

Die Erkrankung zeigt einen saisonalen Verlauf: in gemäßigten Breiten, in denen die Temperatur den limitierenden Faktor für das Überleben der Leptospiren darstellt, ist der Höhepunkt der Erkrankungsfälle im Sommer oder Herbst; in warmen Klimaten findet man die höchste Inzidenz während der Regensaison, da ansonsten eine rasche Austrocknung das Überleben der Leptospiren verhindern würde.

Natürliche Reservoirs der pathogenen Spezies *Leptospira interrogans* umfassen Nager sowie eine Vielzahl domestizierter Säugetiere (z. B. Schweine, Rinder und Hunde). Leptospiren besiedeln in ihrem natürlichen Wirt das Lumen der Nierentubuli und werden mit dem Urin ausgeschieden.

Der Mensch kann sich durch direkten oder indirekten Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere anstecken. Leptospiren erhalten Zugang zum menschlichen Blutkreislauf über kleinere Hautverletzungen (Schnitte, Abschürfungen) oder über die Schleimhäute bei Kontakt mit feuchter Erde, Vegetation und kontaminiertem Wasser, beim Umgang mit Geweben infizierter Tiere und über Nahrung und Trinkwasser. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nur in seltenen Fällen beschrieben worden.

Die Inkubationszeit der Leptospirose beträgt gewöhnlich 5-14 Tage, mit einer Spannweite von 2-30 Tagen.

Das Spektrum klinischer Symptome ist äußerst vielfältig. Die überwiegende Mehrheit der *Leptospira*-Infektionen ist entweder subklinisch oder verläuft sehr mild und heilt ohne Komplikationen aus. Klinische Manifestationen der Leptospirose reichen von milden Grippeähnlichen Symptomen bis hin zu schweren, lebensbedrohlichen Formen, charakterisiert durch Gelbsucht, Nierenversagen und schwere pulmonale Hämorrhagien.

Häufig wird ein biphasischer Krankheitsverlauf beobachtet. Eine akute oder septikämische Phase geht nach ungefähr einer Woche in eine Immunphase über, die durch Antikörperproduktion und Ausscheidung der Leptospiren im Urin gekennzeichnet ist. Die meisten Komplikationen der Leptospirose sind mit der Lokalisierung der Leptospiren innerhalb der Gewebe während der Immunphase assoziiert und liegen in der Immunantwort des Körpers begründet. Das klassische Syndrom der Weil-Krankheit stellt nur die schwerste Ausprägung dar. Sie ist gekennzeichnet durch Gelbsucht, Nierenversagen, Hämorrhagie und Myokarditiden mit Arrhythmien.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Übertragungsweg
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirose	Milde, grippeähnliche Symptome bis fulminant verlaufende, septische Erkrankungen	Direkter oder indirekter Kontakt mit dem Urin infizierter Tiere (z. B. über kleine Hautverletzungen, Schleimhäute)
	Morbus Weil	Nierenversagen, Ikterus, Splenomegalie	

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch

- Erregernachweis: Dunkelfeldmikroskopie
Kultur aus Blut, Urin, Liquor oder Gewebeprobe
PCR
- Serologie: Mikroskopischer Agglutinationstest (MAT), ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Leptospira* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Leptospira* spp. in humanem Serum oder Plasma (Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen IgG-Antikörpern gegen *Leptospira* spp. beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit *Leptospira* spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human IgG-Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Leptospira beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *Leptospira* Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; < 0,1 % MIT; < 0,1 % CMIT; < 0,1 % Na₃.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; < 1 % Ethanol; < 0,5 % Bromonitrodioxan.

- **Leptospira anti-IgG-Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe; < 1 % Ethanol; < 0,5 % Bromonitrodioxan.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,04 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 0,1 % MIT; < 0,1 % CMIT; < 0,01 % H₂O₂.
- **Leptospira IgG Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; < 0,1 % Bromonitrodioxan; < 0,1 % MIT.
- **Leptospira IgG Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; < 0,1 % Bromonitrodioxan; < 0,1 % MIT.
- **Leptospira IgG Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 ml Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; < 0,1 % MIT; < 0,1 % CMIT; < 0,1 % NaN₃.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Aqua dest.
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Standards/Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit Leptospira Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschlösung (20x konz.)

Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1 + 19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und der Standards/Kontrollen auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

- | | | |
|----------------|---------------|------------------------------------|
| 1 Vertiefung | (z. B. A1) | für den Substratleerwert (Blank), |
| 1 Vertiefung | (z. B. B1) | für die Negativ Kontrolle, |
| 2 Vertiefungen | (z. B. C1+D1) | für die Cut-off Kontrolle und |
| 1 Vertiefung | (z. B. E1) | für die Positiv Kontrolle vorsehen |

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Standards/Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µl Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 100 µl Leptospira anti-IgG-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in **A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativkontrolle** in B1: Extinktion < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: $0,44 \text{ OD Cut-off Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off Kontrolle} = 0,86 : 2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

9.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-off}} =$ [NovaTec Einheiten = NTU]

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grauzone	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (OD)</u>	<u>Vk (%)</u>
Probe #1	23	0,437	3,2
Probe #2	24	0,994	2,4
Probe #3	24	0,544	2,4

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert (NTU)</u>	<u>Vk (%)</u>
Probe #1	12	21,97	8,2
Probe #2	12	13,10	3,5

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 97,4 %.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist > 98 %.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,5 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5. Kreuzreaktivität

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine polyklonale B-Zell Aktivierung durch das Epstein-Barr Virus (EBV) oder die Anwesenheit von Rheumafaktoren falsch-positive Leptospira IgG Ergebnisse zur Folge haben können.

Hinweis:	Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.
----------	---

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die

Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.

- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.
- Die Konzentration, der unter Punkt 4.1. angegebenen gefährlichen Substanzen ist sehr gering. Daher ist es unwahrscheinlich, dass von ihnen ein toxikologisches Risiko ausgeht. Dennoch sollte bei Kontakt mit Augen, Haut oder Schleimhaut mit viel Wasser gespült werden und im Fall von Irritationen ein Arzt konsultiert werden. Alle Reagenzien sind mit der angemessenen Vorsicht zu behandeln.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: LEPG0660 Leptospira IgG-ELISA (96 Bestimmungen)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis (también conocida como síndrome de Weils) es probablemente la zoonosis más extendida en el mundo. Es causada por la infección con espiroquetas del género *Leptospira* y afecta a humanos y a un amplio rango de animales. La incidencia es significativamente más alta en países de climas cálidos que en regiones con climas templados. La enfermedad es estacional, con una incidencia máxima durante verano u otoño en regiones templadas, donde la temperatura es el factor limitante en la supervivencia de las leptospirosis, y durante estaciones lluviosas en regiones con clima cálido, ya que donde de otro modo la rápida desecación prevendría la supervivencia de las leptospirosis.

Los reservorios naturales del patógeno *Leptospira interrogans* incluyen roedores así como una gran variedad de mamíferos domesticados (p. ej: cerdos, ganado y perros). Las leptospirosis ocupan el lumen de los túbulos nefríticos en sus hospederos naturales y son transportados hacia la orina.

La transmisión puede ocurrir cuando los humanos son directa o indirectamente expuestos a la orina de un animal infectado o a un ambiente contaminado con orina. Las leptospirosis logran entrar al flujo sanguíneo humano mediante cortes, abrasiones cutáneas o membranas mucosas mediante el contacto con suelo húmedo, vegetación, y aguas contaminadas; por el manejo de tejidos animales infectados; y la ingesta de comida o agua.

Las leptospirosis son raramente transmitidas de humano a humano.

El periodo de incubación es usualmente de 5-14 días, con un rango de 2-30 días.

El espectro de los síntomas clínicos es extremadamente amplio. La gran mayoría de infecciones leptospirales son subclínicas o resultan en enfermedades muy leves de las cuales las personas se recuperan sin complicaciones. Las manifestaciones clínicas de leptospirosis varían desde síntomas parecidos a los de una leve influenza hasta formas severas de enfermedades que amenazan la vida, caracterizadas por ictericia, fallo renal, sangrado y hemorragia pulmonar severa.

La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, con una fase aguda o septicémica que dura alrededor de una semana, seguida de una fase inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y la excreción de leptospirosis en la orina. La mayoría de las complicaciones de la leptospirosis están asociadas con la localización de leptospirosis dentro de los tejidos durante la fase inmune y esto ocurre durante la segunda semana de la enfermedad. El clásico síndrome de la enfermedad de Weils representa solo la presentación más severa. Esta es caracterizada por ictericia, fallo renal, hemorragia y miocarditis con arritmias.

Especie	Enfermedad	Síntomas	Mecanismo de Infección
<i>Leptospira</i> spp.	Leptospirosis Enfermedad de Weil	Amplio espectro de síntomas clínicos: desde síntomas similares a los de una leve influenza a formas severas de enfermedad que amenazan la vida ictericia, fallo renal, hemorragia y miocarditis con arritmias	contacto directo o indirecto con la orina de un animal infectado (vía corte, abrasión cutánea o membranas mucosas)

La presencia del patógeno de infección respiratoria puede ser identificada por

- Detección del patógeno: microscopía de campo oscuro
cultivo de sangre, orina, fluido cerebroespinal o tejidos
PCR
- Serología: prueba de aglutinación microscópica (MAT), ELISA

2. USO PREVISTO

El *Leptospira* IgG-ELISA está diseñado para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG contra *Leptospira* spp. en suero o plasma humano (heparina).

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de los anticuerpos Ig-G en contra de *Leptospira* spp. está basada en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Los pocillos de las tiras de microtitulación están cubiertas con antígenos de *Leptospira* para unirse con los correspondientes anticuerpos de las muestras. Luego de lavar los pocillos para remover el material no unido, se añade peroxidasa de rábano (HPR) marcada y conjugada con anticuerpos anti-IgG humano. Este conjugado se une a los anticuerpos específicos para *Legionella* capturados. El inmunocomplejo formado por la unión del conjugado es visualizado añadiendo el sustrato Tetrametilbenzidina (TMB) que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional con la cantidad de anticuerpos específicos IgG contra *Legionella* en la muestra. El ácido sulfúrico es añadido para parar la reacción. Este produce un color final amarillo. Los resultados se leen a una absorbancia de 450 nm empleando un lector de ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Pocillos cubiertos de *Leptospira* (IgG):** 12 tiras desechables con 8-pocillos cubiertos con antígenos de *Leptospira*; en papel de aluminio con cierre-fácil.
- **Diluyente para IgG de la muestra:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para usar; tapa blanca; < 0.1 % MIT; < 0.1 % CMIT; < 0.1 % NaN₃.
- **Solución de Parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0.2 mol/l; listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 ml de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0.2 M) para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca; < 1 % Etanol; < 0.5 % Bromonitrodioxane.

- **Conjugado IgG anti-humano (Leptospira):** 1 botella de 20 ml de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa en tampón fosfato (10 mM); color azul; listo para ser utilizado; tapa negra; < 1 % Etanol; < 0.5 % Bromonitrodioxane.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.04%; listo para ser usado; color amarillo; < 0.0001% CMIT; < 0.0001 % MIT; < 0.01 % H₂O₂.
- **Control positivo de IgG (Leptospira):** 1 vial de 2 ml de control (suero o plasma humano); color amarillo; listo para ser usado; tapa roja; < 0.1 % Bromonitrodioxan; < 0.1 % MIT.
- **Control Cut-off de IgG (Leptospira):** 1 vial de 3 ml de control (suero o plasma humano); color amarillo; listo para ser usado; tapa amarilla; < 0.1 % Bromonitrodioxan; < 0.1 % MIT.
- **Control Negativo IgG (Leptospira):** 1 vial de 2 ml de control (suero o plasma humano); color amarillo; listo para ser usado; tapa azul; < 0.1 % MIT; < 0.1 % CMIT; < 0.1 % NaN₃.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con puntas desechables (10-1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Agua desionizada o (recientemente) destilada

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

El test tiene que estar almacenado de 2...8 °C. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los estándares/controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25 °C) ;antes de ser utilizados!

6.1. Microtiras

Las tiras separables están recubiertas con antígeno de Leptospira. Inmediatamente después de remover los pocillos, mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar a 2...8 °C.

6.2. Solución de lavado (20x conc.)

Diluir la solución de lavado 1 + 19; p. ej. 10 ml Solución de Lavado + 190 ml agua redestilada fresca y libre de gérmenes. La solución diluida es estable por 5 días a temperatura ambiente. La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37 °C en baño de agua.

6.3. Solución de TMB

La solución está lista para ser utilizada y tiene que ser almacenada a 2...8 °C en oscuridad. La solución debe ser incolora o levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrate) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el tampón de dilución para la muestra de IgG, p. e. 10 µl de la muestra con 1 ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo antes de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevas el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos:

1 pocillo	(p. ej. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(p. ej. B1)	para el control negativo
2 pocillo	(p. ej. C1+D1)	Para el control Cut-off y
1 pocillo	(p. ej. E1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de estándares/controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso. Graduar la incubadora a 37 ± 1 °C.

1. Pipetear 100 µl de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar por 1 hora \pm 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!
5. Pipetear 100 µl de conjugado anti-IgG Leptospira en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).**
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.
11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, ¡hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la hoja de resultados.

Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1: extinción < **0.100**
- **Control Negativo** en B1: extinción < **0.200 and < Cut-off**
- **Control Cut-off** en C1 y D1: extinción **0.150 – 1.300**
- **Control Positivo** en E1: extinción > **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: $0.42 \text{ OD Control Cut-off} + 0.44 \text{ OD Control Cut-off} = 0.86 / 2 = 0.43$
Cut-off = 0.43

9.2.1. Resultados en Unidades [NTU]

Paciente (media) valor de absorbancia x $\frac{10}{\text{Cut-off}}$ = [Unidades NovaTec = NTU]

Ejemplo: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU (Unidades)}$

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es equívoca de nuevo la muestra se considera como negativo .
Negativo	< 9 NTU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.		

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Intraensayo	n	Media (OD)	CV (%)
Muestra #1	23	0.437	3.2
Muestra #2	24	0.994	2.4
Muestra #3	24	0.544	2.4
Interensayo	n	Media (NTU)	CV (%)
Muestra #1	12	21.97	8.2
Muestra #2	12	13.10	3.5

10.2. Especificidad Diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Esta es 97.4 %.

10.3. Sensibilidad Diagnóstica

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Esta es > 98 %.

10.4. Interferencias

Interferencias con muestras hemolíticas, lipémicas o ictericas no han sido observadas hasta una concentración de 10 mg/ml de hemoglobina, 5 mg/ml de triglicéridos y 0.5 mg/ml de bilirrubina.

10.5. Reactividad cruzada

No puede ser excluido que la activación de células B policlonales inducidas por el Virus Epstein-Barr o la presencia de Factor Reumatoideo puedan resultar en un falso positivo de anticuerpo IgG contra Leptospira.

Nota: Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir

usándolas.

- Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.
- Las concentraciones de las sustancias peligrosas mencionadas en 4.1 son muy bajas. Por lo tanto, no hay casi ningún riesgo toxicológico. Sin embargo enjuague con abundante agua al entrar en contacto con los ojos, la piel o las membranas mucosas y consultar a un médico en caso de irritación. Todas las soluciones deben ser manejadas con el cuidado adecuado.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: LEPG0660 Leptospira IgG-ELISA (96 Determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

Adler, B.; Murphy, A.M.; Locarnini, S.A.; Faine, S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* May 1980 vol. 11 no. 5 452-457.

Ahmad, S.N.; Shah, S.; Ahmad, F.M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005;51:195-200.

Cruz, L.S.; Vargas, R.; Lopes, A.A. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis.* 2009 Spring;19(1 Suppl 1):S1-37-41.

Doungchawee, G.; Sirawaraporn, W.; Icksang-Ko, A.; Kongtim, S.; Naigowit, P.; Thongboonkerd, V. Use of immunoblotting as an alternative method for serogrouping *Leptospira*. *J Med Microbiol.* 2007 May;56(Pt 5):587-592.

Jansen, A.; Stark, K. (2006): Leptospirose (Kap. VIII - 1.25). In: F. Hofmann (Hrsg), *Handbuch der Infektionskrankheiten: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe, Gesetzliche Regelungen*, 2. Aufl., 17. Erg.Lfg. 11/06. Landsberg/Lech: EcoMed, S. 1-13.

Johnson, R. C. (2001) *Leptospira*. In: *Medical Microbiology*. edited by Baron, S. The University of Texas Medical Branch

Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):296-326.

Sanders, E.J.; Rigau-Pérez, J.G.; Smits, H.L.; Deseda, C.C.; Vorndam, V.A.; Aye, T.; Spiegel, R.A.; Weyant, R.S.; Bragg, S.L. Increase of leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996 [correction of 1966]. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Sep;61(3):399-404.

Terpstra, W.J.; Ligthart, G.S.; Schoone, G.J. ELISA for the detection of specific IgM and IgM in human leptospirosis. *J Gen Microbiol.* 1985 Feb;131(2):377-385.

Utzinger, J.; Becker, S.L.; Knopp, S.; Blum, J.; Neumayr, A.L.; Keiser, J.; Hatz, C.F. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly.* 2012 Nov 22;142:w13727.

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008 Nov;33(4):557-69.

World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO (2003).

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

MIT	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one
CMIT	5-Chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-one
NaN₃	Sodium azide / Natriumazid
H₂O₂	Hydrogen peroxide / Wasserstoffperoxid

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / MarcaCE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaque / Micropiastra / Microplaca / Microplaca
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
CONTROL -	Control, negative / Kontrolle, negative / contrôle négatif / controllo, negativo / control negativo / controle negativo / controllo negativo
CONTROL +	Control, positive / Kontrolle, positiv / contrôle positif / controllo, positivo / control positivo / controllo positivo
CUT OFF	Cut off control / Cut off Kontrolle / contrôle du Cut-off / controllo, Cut-off / control Cut-off / controllo Cut-off
DIL G	Sample diluent buffer IgG / IgG-Probenverdünnungspuffer / Tampon diluant pour échantillon IgG / soluzione tampone per i campioni IgG / solución tampón para muestras IgG / Tampão diluente para amostras IgG
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Substrat TMB / soluzione substrato TMB / solución substrato TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated / Waschlösung 20x konzentriert / Solution de lavage concentré 20 x / soluzione di lavaggio concentrazione x20 / solución de lavado concentrado x20 / Solução de lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

ESQUEMA DEL ENSAYO

ELISA IgG Leptospira

Preparación de la Prueba

Preparar los reactivos como se ha descrito.
 Establecer el plan de distribución e identificación para todas las muestras y controles en la hoja de resultados suministrada en el kit.
 Seleccionar el número necesario de tiras de microtitulación o de pocillos e insértelos en el soporte.

Preparación del Ensayo

	Sustrato Blanco (p. ej. A1)	Control Negativo	Control Cut-off	Control Positivo	Muestra (diluída 1+100)
Control Negativo	-	100 µl	-	-	-
Control Cut-off	-	-	100 µl	-	-
Control Positivo	-	-	-	100 µl	-
Muestra (diluída 1+100)	-	-	-	-	100 µl
Cubrir los pocillos con la lámina autoadhesiva suministrada en el kit Incubar por 1 h a 37 °C Lavar cada pocillo tres veces con 300µl de Solución de Lavado					
Conjugado	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Cubrir los pocillos con la lámina autoadhesiva suministrada en el kit Incubar por 30 min a temperatura ambiente Lavar cada pocillo tres veces con 300µl de Solución de Lavado					
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubar por exactamente 15 min a temperatura ambiente en oscuridad					
Solución de Parada	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Medición fotométrica a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
 D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629
 Email: info@NovaTec-ID.com
 Internet: www.NovaTec-ID.com