

PACKAGE INSERT DISCLAIMER:

The product information on the following pages is believed to be accurate and correct. This document is **NOT** a substitute for the actual Product Information Inserts and should **NOT** be used in the performance of Diagnostic Testing.



Leptospira IgG Microwell Serum ELISA
Directions For Use

LEPTO-G 96 Test

Intended Use

The SCIMEDX LEPTOSPIRA Microwell ELISA test is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to *Leptospira biflexa* (serovar patoc 1) for the serological confirmation of infections in serum and plasma. This test is intended to be performed by trained laboratory personnel only.

Summary And Explanation

The clinical manifestations of leptospirosis range from a mild catarrh-like illness to icteric disease with severe liver and kidney involvement. Natural reservoirs for leptospirosis include rodents as well as a large variety of domesticated mammals. The organisms occupy the lumen of nephritic tubules in their natural host and are shed into the urine. Human infection derives from direct exposure to infected animals (veterinarians, abattoir workers, or dairy workers for example) or by exposure to environments contaminated by animal carriers (e.g. agricultural workers). Bathing or swimming in water sources about which livestock have been pastured has been demonstrated to be a potential infection hazard. The organisms enter the host through skin abrasions, mucosal surfaces or the eye. The incubation period can range from 3 to 30 days but is usually found to be 10 to 12 days. Antibodies can become detectable by the 6th to 10th day of disease and generally reach peak levels within 3 to 4 weeks. Antibody levels then gradually recede but may remain detectable for years.

Epidemiologic factors, clinical findings, exposure in endemic regions and other laboratory results should be considered in diagnosing acute disease. Acute disease diagnosis will also include a positive laboratory confirmation in many cases. This test is designed to measure acute infections with leptospira. Confirmation of a positive sample by additional methods should be followed.

Assay Principle

The microwells are coated with purified *Leptospira Patoc 1* antigen. During the first incubation with the diluted patients' sera, any antibodies which are reactive with the antigen will bind to the coated wells. After washing to remove the rest of the sample, the Enzyme Conjugate is added. If antibodies have been bound to the wells, the Enzyme Conjugate will then bind to these antibodies. After another series of washes, a chromogen (tetramethylbenzidine, or TMB) is added. If the Enzyme Conjugate is present, the peroxidase will catalyze a reaction that consumes the peroxide and turns the chromogen from clear to blue. Addition of the Stop Solution ends the reaction and turns the blue color to a bright yellow color. The reaction may then be read visually or with an ELISA reader.

Reagents

| Item | Description | Symbol |
|------------------------|---|------------------|
| Test Strips | Microwells containing <i>Leptospira</i> antigen - 96 test wells in a test strip holder. | MT PLATE |
| Enzyme Conjugate | One (1) bottle containing 11 ml of anti-human IgG antibody conjugated to peroxidase. | CONJ |
| Positive Control | One (1) vial containing 1 ml of diluted surrogate positive control. | CONTROL + |
| Negative Control | One (1) vial containing 1 ml of diluted negative human serum | CONTROL - |
| Chromogen | One (1) bottle containing 11 ml of the chromogen tetramethylbenzidine (TMB). | SUBS TMB |
| Wash Concentrate (20X) | One (1) bottle containing 25 ml of concentrated buffer and surfactant. | WASH BUF |
| Dilution Buffer | Two (2) bottles containing 30 ml of buffered protein solution. | SPECM DIL |
| Stop Solution | One (1) bottle containing 11 ml of 0.73 M phosphoric acid. | SOLN |

Statement Of Warnings

- **Do not deviate from the specified procedures when performing this assay.** All specimen dilutions, incubation times/temperatures and washings have been optimized for the best performance characteristics. Deviations from the specified procedures may affect the sensitivity and specificity of the assay.
- For In Vitro Diagnostic Use Only.

- Do not interchange reagents between kits with different lot numbers.
- Do not use reagents that are beyond their expiration dates. Expiration dates are on each reagent label. Use of reagents beyond their expiration dates may affect results.
- Unused microwells should be stored in the desiccated pouch to protect them from moisture.
- Do not use solutions if they precipitate or become cloudy.
 - Exception:** Wash concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will dissolve upon warming.
- Do not add azides to the samples or any of the reagents.
- Controls and some reagents contain thimerosal as a preservative, which may be irritating to skin, eyes and mucous membranes. In case of contact, flush eyes or rinse skin with copious amounts of water.
- Do not use serum that may have supported microbial growth, or is cloudy due to high lipid content. Samples high in lipids should be clarified before use.
- Treat all reagents and samples as potentially infectious materials. Negative control has been tested and found negative for Hepatitis B surface antigen and for the antibody to HIV be required test methods. Use care to prevent aerosols and decontaminate any spills of samples.
- Stop solution is a 5% solution of phosphoric acid in water. If spilled on the skin, wash with copious amounts of water. If acid gets into the eyes, wash with copious amounts of water and seek medical attention.
- Persons who are color blind or visually impaired may not be able to read the test visually and should use spectrophotometric readings to interpret results.

Storage

- Reagents, strips and bottled components should be stored at 2-8 °C
- Squeeze bottle containing diluted wash buffer may be stored at room temperature (15-25 °C)

Preparation

- Before use, bring all reagents and samples to room temperature (15-25 °C) and mix.
- (20X) Wash Concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will go back into solution when brought to room temperature and mixed. **Ensure that (20X) Wash Concentrate is completely in solution before diluting to working concentration.** To dilute (20X) wash concentrate to working dilution, remove cap and add contents of one bottle of Wash Concentrate to a squeeze bottle containing 475 ml of DI water. Swirl to mix. Squeeze bottle should have a narrow tip to optimize washings.

Specimen Collection And Handling

The SCIMEDX Leptospira Microwell ELISA test should be performed on serum or plasma. Serum may be stored at 2-8 °C for up to five days. Serum may be frozen below -20 °C for extended periods. Do not heat inactivate samples and avoid repeated freezing and thawing of samples.

Single specimens are used to assess exposure; two specimens collected at different times from the same individual are used to show sero-conversion. **Paired specimens should be tested at the same time.** It is recommended that a convalescent specimen be collected from patients showing either an initially non-reactive result or a weakly reactive result.

Procedure

Materials Provided

SCIMEDX Leptospira IgG Microwell ELISA Kit

Materials Required But Not Provided

- Micropipette
- Squeeze bottle for washing strips (narrow tip is recommended)
- Reagent grade (DI) water
- Graduated Cylinder
- Sample Dilution Tubes
- Absorbent paper

Suggested Materials

ELISA plate reader with a 450 nm and a 620-650 nm filter (optional if results are read visually)

Proper Temperature

All incubations are at room temperature (15-25 °C)

Test Procedure

Notes:

- Ensure all samples and reagents are at room temperature (15-25 °C)
 - When running the assay, try to avoid the formation of bubbles in the wells. Bubbles may affect overall performance and reading of end results. Slapping the wells out on a clean absorbent towel after each step should help to minimize bubbles in the wells.
 - Negative and positive controls are supplied pre-diluted. DO NOT dilute further.
1. Break off number of wells needed (two for controls plus number of samples) and place in strip holder.
 2. Dilute patient sera 1:40 in Dilution Buffer (e.g. 10 µl sera and 390 µl dilution buffer). Add **100 µl** of negative control to well #1, **100 µl** of positive control to well #2 and **100 µl** of the samples to the remaining wells.
 3. Incubate at room temperature for **10 minutes**, then wash.* After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.
 4. Add **2 drops** of Enzyme Conjugate to each well.
 5. Incubate at room temperature for **10 minutes**, then wash.* After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.

6. Add **2 drops** of the Chromogen to each well.
7. Incubate at room temperature for **5 minutes**.
8. Add **2 drops** of the Stop Solution to each well. Mix wells by gently tapping the side of the strip holder with index finger for approximately **15 seconds**.
9. Read within one hour of adding Stop Solution.

* Washings consist of vigorously filling each well to overflowing and decanting contents three (3) separate times. When possible, avoid formation of bubbles in the wells as this may affect the end results.

Reading Results

Visually: Look at each well against a white background (e.g. paper towel) and record as clear or +, ++ or +++ reaction.

ELISA Reader: Zero reader on air. Set for bichromatic readings at 450/620-650 nm.

Quality Control

The use of controls allows validation of kit stability. The kit should not be used if any of the controls are out of range. Expected values for the controls are:

Negative - 0.0 to 0.3 OD units

Positive - 0.5 OD units and above

Troubleshooting

Negative control has excessive color after development.

Reason: inadequate washings

Correction: wash more vigorously. Remove excessive liquid from the wells by tapping against an Absorbent towel.

Do not allow test wells to dry out.

Interpretation Of The Test

Initially Non-reactive: Samples interpreted as non-reactive (0.0-0.3 OD units, or zero color) indicate antibody is not present in the sample. Since antibody may not be present during early disease, (5-8 days incubation), confirmation 2-3 weeks later is indicated for laboratory diagnosis. At this later time, patients showing weak reactions (0.3-1.0 OD or +, ++) should be further tested by alternate methods or re-tested 10-14 days later. A convalescent serum with a significant reaction (>1.0 OD) indicates the formation of specific antibody against leptospira. An initially negative result followed by a positive result implies seroconversion.

Initially Weakly Reactive: Weakly reactive specimens should be cautiously interpreted. In normal populations, weakly reactive samples are infrequent but possible. Confirmation using a sample collected 2-3 weeks later (paired acute and convalescent sera) is recommended. >1.0 OD in the second sample confirms the presence of recent, specific antibody. [Caution: If this is a cross-reactive antibody, the convalescent serum sample may not show a higher antibody level than the acute sample.] If sample reading remains at 0.3-1.0 OD, or +, ++, a second methodology should be considered, or the sample may be interpreted as taken beyond rising titer (titer declining).

Initially Reactive: Samples interpreted as strongly reactive (>1.0 OD or +++) may indicate the presence of specific antibody. Antibody presence alone cannot be used for diagnosis of acute infection, since antibodies from prior exposure may circulate for a prolonged period of time.

Limitations Of The Procedure

Serologic results are an aid in diagnosis but cannot be used as the sole method of diagnosis.

The ELISA has been tested against many serovars, but cannot guarantee that all strains will react equally.

Do not use in veterinary samples.

Treatment is often indicated prior to completion of serologic diagnosis, which requires at least two weeks. Acute leptospirosis must be treated immediately and should not wait for serological confirmation. Diagnosis of leptospira infection should not be made based on results of the ELISA test alone, but in conjunction with other clinical signs and symptoms and other laboratory findings.

Epidemiologic factors, clinical findings, exposure to endemic regions, and other laboratory results should be considered when making a diagnosis.

Many strains and serovars of leptospira are known. Many of the strains are geographically dominant in some areas and not in others. Biflexa Patoc 1 is known to cross react with most serovars **but usually does not cross-react with animal strains**. The relative strength of the reactions may vary by antigen. This must be considered during interpretation. Use of culture or the MAT test is recommended for confirmation as these test are serovar specific.

Since serological assay methods may yield different results for weakly reactive samples, a second serological method (i.e. an alternative method that separately identifies IgM and IgG antibody) is recommended.

Expected Values

The number of antibody positive subjects in a population depends on two factors: disease prevalence and clinical criteria used to select the tested population. Because very few positives should be seen in a randomly screened population in a non-endemic area, most serology tests are not specific enough to screen non-endemic populations. Even in an endemic region, serology screening often yields many false positives if used to randomly screen patients. Serology tests are useful to test patients in an endemic region with signs and symptoms consistent with the disease.

Antibody levels are generally low or absent during very early infection. Symptomatic patients may have no antibody during the first 1-2 weeks after exposure and the antibody titer will rise with time.

Performance Characteristics

| | Reference Method* | |
|---------|-------------------|----|
| | + | - |
| SCIMEDX | 8 | 4 |
| | 2 | 28 |

Positive Agreement: 80% (8/10)

Negative Agreement: 87.5% (28/32)

*Reference Method refers to a commercially available ELISA.

Français

Destiné exclusivement au diagnostic in vitro.

Réactifs

| Item | Description | Symbol |
|--------------------------|---|------------------|
| Plaque de Microtitration | Une plaque de microtitration revêtu avec l'antigène de Lepotospira (96 puits) | MT PLATE |
| Conjugué Enzymatique | 1 flacon de conjugué – 11 ml IgG anti- humain conjugué à peroxidase. | CONJ |
| Contrôle Positif | 1 flacon sérum positif humain (substitut) | CONTROL + |
| Contrôle Négatif | 1 flacon -2 ml sérum négatif humain | CONTROL - |
| Chromogène | 1 flacon- 11 ml Substrat: chromogène (TMB) | SUBS TMB |
| Tampon de Lavage (20X) | 1 flacon - 25 ml tampon de lavage (20X) | WASH BUF |
| Tampon de Dilution | 2 flacons - 30 ml solution de protéine de buffered. | SPECM DIL |
| Solution d'arrêt | 1 flacon - 11 ml Solution d'arrêt : acide phosphorique 0.73 M | SOLN |

Précautions:

- **Veillez respecter les procédures indiquées lors de la réalisation de ce dosage.** Toutes les dilutions d'échantillon, durées et températures d'incubation ainsi que tous les lavages ont été optimisés pour l'obtention des meilleures caractéristiques de performance possibles. Tout non respect des procédures spécifiées pourra affecter la sensibilité et la spécificité du dosage.
- Destiné exclusivement au diagnostic in vitro.
- Ne pas interchanger les réactifs de kits portant des numéros de lot différents.
- Ne pas utiliser les réactifs lorsque leur date de péremption est dépassée. Les dates de péremption sont imprimées sur l'étiquette de chaque réactif. L'utilisation de réactifs dont la date de péremption est dépassée peut affecter les résultats obtenus.
- Les micropuits inutilisés doivent être conservés dans le sac avec le dessiccatif pour les protéger de l'humidité.
- Ne pas utiliser de solutions formant des précipités ou devenant troubles. Le concentré de lavage peut présenter une cristallisation s'il est conservé entre 2 et 8 °C. Cette cristallisation disparaît après dilution à la concentration d'utilisation.
- Ne pas ajouter d'azides aux échantillons ni aux réactifs.
- Les contrôles et certains réactifs contiennent du Thimérosal (conservateur), lequel peut irriter pour écorcher, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, en cas des yeux d'éclat ou en cas du rinçage écorche avec les quantités abondantes d'eau.
- Ne pas utiliser de sérum susceptible de présenter une croissance microbienne ni de sérum trouble en raison d'une forte teneur en lipides. Les échantillons hyperlipémiques doivent être clarifiés avant utilisation.
- Traiter tous les sérums comme étant potentiellement infectieux. Le contrôle négatif a été testé pour l'antigène de surface de l'hépatite B et pour l'anticorps anti-VIH par les méthodes de test requises et a donné des résultats négatifs Ce produit doit être utilisé dans les conditions de sécurité adaptées à l'utilisation d'agents potentiellement infectieux.
- La solution d'arrêt est une solution à 5 % d'acide phosphorique dans de l'eau. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec les yeux, laver abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- Les personnes atteintes d'achromatopsie, ou malvoyantes, peuvent être incapables de lire le test visuellement ; elles doivent utiliser les mesures de spectrophotométrie pour interpréter les résultats.

Conditions de stockage

- Réactifs, bandelettes et composants présentés en flacons : conserver entre 2 et 8 °C.
- La pissette contenant le tampon de lavage dilué peut être conservée à température ambiante.

Préparation

- Avant utilisation, porter tous les réactifs ainsi que les échantillons à température ambiante (15-25 °C) et les mélanger.
- Le concentré de lavage (20X) peut former un précipité lorsqu'il est conservé au réfrigérateur mais reprendra une forme de solution après avoir été porté à température ambiante et mélangé. **Vérifier que le concentré de lavage (20X) est en solution avant de le diluer à la concentration d'utilisation.** Pour diluer le concentré de lavage (20X) à la dilution d'utilisation, retirer le bouchon et ajouter le contenu d'un flacon de concentré de lavage dans une pissette contenant 475 ml d'eau désionisée. Agiter en formant un tourbillon. La pissette doit être équipée d'un embout étroit pour optimiser les lavages.

Prélèvement de l'échantillon

Le test doit être réalisé sur du sérum. Le sérum peut être conservé entre 2 et 8 °C pendant cinq jours au maximum. Le sérum peut être conservé congelé à une température inférieure à -20 °C pendant de longues périodes. Ne pas désactiver les échantillons à la chaleur et éviter toute congélation et décongélation répétées des échantillons.

Pour évaluer l'exposition, on utilise des échantillons isolés ; pour démontrer la séroconversion, on utilise deux échantillons prélevés à deux moments différents sur le même sujet. **Dans ce cas, les deux échantillons doivent être testés simultanément.** Il est recommandé de prélever un échantillon chez les patients convalescents présentant un résultat initialement non réactif ou un résultat faiblement réactif.

Utres matériels requis

Pipettes

Pissette dotée d'un embout étroit

Eau distillée dans un verre ou eau désionisée.

Tubes de dilution d'échantillon

Tissu absorbant

Lecteur de barrettes de micropuits pouvant lire à 450 avec un filtre de référence à 620-650 nm

Température correcte

Toutes les incubations sont à la température ambiante (15-25 °C)

Procédure de test

Note:

- Veiller à ce que tous les échantillons et réactifs soient à température ambiante (15-25 °C)
 - Lors de la réalisation du dosage, éviter la formation de bulles dans les puits. Les bulles peuvent affecter les performances globales du test et la lecture des résultats finals. La formation de bulles dans les puits peut être minimisée en tapotant les puits sur un tissu absorbant propre après chaque étape.
 - Les contrôles négatifs et positifs sont fournis pré-dilués. NE PAS les diluer.
1. Détacher le nombre de puits nécessaires (deux pour les contrôles, plus un puits par échantillon) et les placer dans le portoir de bandelettes.
 2. Ajouter **100 µl** de contrôle négatif au puits n° 1, **100 µl** de contrôle positif au puits n° 2 et **100 µl** des échantillons de test dilués (à 1:40) dans les puits restants. Les contrôles négatifs et positifs sont fournis pré-dilués. NE PAS les diluer.
 3. Incuber à température ambiante pendant **10 minutes** puis procéder à un lavage.* Après la dernière étape de lavage, tapoter les puits sur un tissu absorbant propre pour éliminer l'excès de tampon de lavage.
 4. Ajouter **2 gouttes** de conjugué enzymatique à chaque puits.
 5. Incuber à température ambiante pendant **10 minutes** puis procéder à un lavage.* Après la dernière étape de lavage, tapoter les puits sur un tissu absorbant propre pour éliminer l'excès de tampon de lavage.
 6. Ajouter **2 gouttes** de chromogène à chaque puits.
 7. Incuber à température ambiante pendant **5 minutes**
 8. Ajouter **2 gouttes** de solution d'arrêt à chaque puits. Mélanger les puits en tapotant doucement le côté du support de bandelettes avec l'index pendant environ **15 secondes**.
 9. Lire les résultats dans l'heure suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

* Les lavages consistent à remplir vigoureusement chaque puits jusqu'à débordement et à transférer le contenu trois (3) fois. Lorsque c'est possible, éviter la formation de bulles dans les puits ; cela pourrait en effet affecter les résultats finals.

Lire résultat

Visuellement: Examiner chaque puits sur un fond blanc et noter la réaction comme transparente ou +, ++ ou +++.

Lecteur ELISA : Mettre à zéro sur l'air le lecteur ELISA, lire les puits à 450 nm avec un filtre de référence à 620-650 nm.

Contrôle qualité

L'utilisation de contrôles permet de valider la stabilité du kit. Le kit ne doit pas être utilisé si l'un des contrôles donne des résultats en dehors des limites spécifiées.

Les résultats attendus pour les contrôles sont :

Contrôle négatif : 0.0 – 0.3 unités DO

Contrôle positif : 0.5 unités DO et plus

Résolution des problèmes: le contrôle négatif présente une coloration excessive après développement

Cause: lavages inadéquats

Mesure de correction: laver plus vigoureusement. Éliminer l'excès de liquide des puits en tapotant sur un tissu absorbant. Ne pas laisser sécher les puits.

Interprétation des résultats

Initialement non réactif : les échantillons non réactifs (0,0-0,3 unités DO ou absence de coloration) sont des échantillons ne contenant pas l'anticorps. Comme l'anticorps peut ne pas être présent au début de la maladie (5-8 jours d'incubation), il est indiqué de réaliser un test de confirmation 2-3 semaines plus tard en laboratoire. Lors du test de confirmation, les échantillons de patient présentant une réaction faible (0,3-1,0 DO ou +, ++) doivent de nouveau être testés par une autre méthode ou 10-14 jours plus tard. Un sérum de convalescence présentant une réaction significative (>1,0 DO) indique la formation d'anticorps spécifiques contre *Leptospira*. Un résultat initialement négatif suivi d'un résultat positif indique une séroconversion.

Initialement faiblement réactif : les échantillons initialement faiblement réactifs doivent être interprétés avec soin. Dans la population normale, il est rare mais possible d'obtenir des échantillons faiblement réactifs. Il est recommandé de confirmer le résultat sur un échantillon prélevé 2 à 3 semaines plus tard (échantillon aigu et échantillon de convalescence appariés). Un résultat >1,0 DO dans le second échantillon confirme la présence d'anticorps spécifiques récemment apparus. [Attention : s'il s'agit d'un anticorps provoquant une réaction croisée, l'échantillon de sérum de convalescence pourrait ne pas contenir un titre d'anticorps supérieur à celui de l'échantillon aigu]. Si le résultat de l'échantillon reste à un niveau de 0,3-1,0 DO ou +, ++, envisager d'utiliser une autre méthode ou interpréter le résultat comme étant dû au prélèvement de l'échantillon après élévation du titre (pendant le déclin du titre).

Initialement réactif : les échantillons interprétés comme fortement réactifs (>1,0 DO ou +++) peuvent indiquer la présence d'anticorps spécifiques. La seule présence de l'anticorps ne peut être utilisée pour le diagnostic de l'infection aiguë car des anticorps apparus lors d'une exposition antérieure peuvent circuler pendant une période prolongée.

Limites de la procédure

Bien que les résultats sérologiques facilitent le diagnostic, celui-ci ne doit pas reposer exclusivement sur cette méthode.

Ne pas utiliser pour des échantillons vétérinaires.

Le traitement est souvent prescrit avant la fin du diagnostic sérologique, qui nécessite au moins deux semaines. La leptospirose aiguë doit être traitée immédiatement sans attendre la confirmation sérologique. Le diagnostic d'une infection par *Leptospira* ne doit pas reposer exclusivement sur les résultats du test ELISA, mais aussi sur les autres signes et symptômes cliniques, ainsi que sur d'autres examens biologiques.

Des facteurs épidémiologiques, le tableau clinique, l'exposition dans des régions endémiques et d'autres tests biologiques doivent être pris en compte dans le diagnostic.

De nombreuses souches et de nombreux sérotypes de *Leptospira* sont connus. Un grand nombre des souches sont dominantes dans certaines régions géographiques et pas dans d'autres. Biflexa Patoc 1 est connu pour entraîner une réaction croisée avec la plupart des sérotypes **mais pas avec les souches animales**. La force relative des réactions peut varier selon l'antigène. Cet élément doit être pris en compte pour l'interprétation. L'utilisation d'une culture ou du test MAT est recommandée pour la confirmation car ces tests sont spécifiques de sérotype.

Comme les méthodes de dosage sérologique peuvent donner des résultats différents pour les échantillons faiblement réactifs, une seconde méthode sérologique (c'est-à-dire une autre méthode permettant d'identifier séparément les IgM et les IgG) est recommandée.

Valeurs prévues

Le nombre de sujets positifs pour l'anticorps dans une population dépend de deux facteurs : la prévalence de la maladie et les critères cliniques utilisés pour sélectionner la population soumise au test. Comme un dépistage aléatoire dans une population en zone non endémique ne donne généralement que très peu de résultats positifs, la plupart des tests sérologiques ne sont pas suffisamment spécifiques pour un dépistage dans des populations non endémiques. Même dans une région endémique, le dépistage sérologique donne souvent de nombreux faux positifs s'il est utilisé pour un dépistage aléatoire. Les tests sérologiques sont utiles pour tester les patients en zone endémique lorsqu'ils présentent des signes et des symptômes de la maladie.

Les concentrations d'anticorps sont généralement faibles ou nulles au tout début de l'infection. Les patients présentant des symptômes peuvent ne pas présenter d'anticorps pendant 1 à 2 semaines après exposition et le titre d'anticorps augmente au fil du temps.

Caractéristiques de performance

| | Méthode de référence * | |
|---------|------------------------|----|
| | + | - |
| SCIMEDX | 8 | 4 |
| | 2 | 28 |

Accord positif: 80% (8/10)

Accord négatif: 87.5% (28/32)

* Méthode de référence se réfère à un ELISA disponible dans le commerce.

Deutsch

Nur zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnostik.

Reagenzien

| Item | Description | Symbol |
|-----------------------|---|------------------|
| Eine Mikrotiterplatte | Eine Mikrotiterplatte (12 X 8 Abbrechkavitäten) beschichtet mit <i>Leptospira</i> Antigen | MT PLATE |
| Enzym-Konjugat | 1 Fläschchen 11ml Anti-mensch IgG hat zu peroxidase konjugiert. | CONJ |
| Positive Kontrolle | 1 Fläschchen 2 ml Verdünnten Surrogat serum. | CONTROL + |

| | | |
|-----------------------|--|------------------------|
| Negative Kontrolle | 1 Fläschchen 2 ml Verdünnten negatives humanserum. | CONTROL — |
| Chromogen | 1 Fläschchen 11 ml chromogen tetramethylbenzidine (TMB). | SUBS TMB |
| Waschkonzentrat (20X) | 1 Fläschchen 25 ml Konzentrierte Puffer und surfactant. | WASH BUF |
| Verdünnungspuffer | 2 Fläschchen 30 ml Gepufferte Eiweißlösung. | SPECM DIL |
| Stopplösung | 1 Fläschchen 11 ml 0.73 M Phosphorsäurelösung | SOLN |

Vorsichtsmaßnahmen

- **Weichen Sie bei der Durchführung dieses Assays nicht vom beschriebenen Verfahren ab.** Alle Probenverdünnungen, Inkubationszeiten bzw. -temperaturen und Waschstufen sind im Hinblick auf bestmögliche Leistung des Assays optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren können die Sensitivität und Spezifität des Assays beeinträchtigen.
- Nur zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnostik.
- Tauschen Sie keine Reagenzien zwischen Kits mit verschiedenen Chargennummern aus.
- Verwenden Sie keine Reagenzien, deren Verfallsdatum abgelaufen ist. Das Verfallsdatum ist auf die Reagenzietiketten aufgedruckt. Die Verwendung von Reagenzien, deren Verfallsdatum abgelaufen ist, kann die Ergebnisse beeinträchtigen.
- Nicht verwendete Mikrotiterplatten sollten im Trockenbeutel aufbewahrt werden, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen.
- Verwenden Sie die Lösungen nicht, wenn sich ein Niederschlag oder eine Trübung gebildet hat. Wenn das Waschkonzentrat bei 2 - 8 °C gelagert wird, können sich Kristalle darin bilden. Beim Verdünnen auf die Arbeitskonzentration lösen sich die Kristalle auf.
- Fügen Sie den Proben oder den Reagenzien kein Azid zu.
- Die Kontrollen und einige weitere Reagenzien enthalten Thimerosal als Konservierungsmittel, welcher reizen darf, zu enthäuten, Augen und Schleimhäute. In der Fallkontakt spült Augen oder Spülungshaut mit reichhaltigen Beträgen des Wassers.
- Serum, in dem möglicherweise Bakterien gewachsen sind oder das aufgrund eines hohen Lipidgehalts trüb erscheint, darf nicht verwendet werden. Aus Proben mit hohem Lipidgehalt muss vor der Verwendung das Lipid entfernt werden.
- Behandeln Sie alle Seren als infektiöses Material. Die Kontrollen wurden getestet und mit den erforderlichen Testmethoden als negativ für Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Antikörper gegen HIV befunden. Bei Verwendung dieses Produkts müssen die im Fall von infektiösem Material erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen eingehalten werden.
- Die Stopplösung ist eine 5%ige Phosphorsäurelösung in Wasser. Bei Verschütten auf die Haut mit viel Wasser abspülen. Wenn Säure in die Augen gerät, mit viel Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.
- Personen, die farbenblind oder sehbehindert sind, können u. U. das Testergebnis nicht visuell ablesen und sollten stattdessen zur Interpretation der Ergebnisse eine Messung im Photometer durchführen.

Lagerbedingungen

- Reagenzien, Teststreifen und Komponenten in Flaschen: Zwischen 2 - 8 °C lagern.
- Die Spritzflasche mit dem verdünnten Waschkonzentrat kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

Herstellen der Reagenzien:

- Bringen Sie vor der Verwendung alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (15 - 25 °C) und mischen Sie sie gründlich.
- Im (20x) Waschkonzentrat kann sich bei Lagerung im Kühlschrank ein Niederschlag bilden, der sich jedoch wieder auflöst, wenn das Konzentrat auf Raumtemperatur gebracht und gemischt wird. **Achten Sie darauf, dass sich sämtlicher Niederschlag im (20x) Waschkonzentrat aufgelöst hat, bevor Sie es auf die Arbeitskonzentration verdünnen.** Um das (20x) Waschkonzentrat auf die Arbeitskonzentration zu verdünnen, entfernen Sie den Deckel und geben Sie den Inhalt einer Flasche Waschkonzentrat in eine Spritzflasche mit 475 ml deionisiertem Wasser. Gründlich mischen. Ein optimales Waschergebnis erzielen Sie, wenn die Spritzflasche eine enge Spitze hat.

Probengewinnung

Der Test muss in Serum durchgeführt werden. Serum kann bei 2 - 8 °C bis zu fünf Tage lang gelagert werden. Serum kann unterhalb von -20 °C längere Zeit eingefroren werden. Die Proben dürfen nicht hitzeinaktiviert werden. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben.

Einzelne Proben werden zum Nachweis einer Exposition eingesetzt; zwei Proben, die derselben Person zu verschiedenen Zeiten abgenommen wurden, werden zum Nachweis der Serokonversion verwendet. **Gepaarte Proben müssen zur selben Zeit getestet werden.** Es ist empfehlenswert, von einem Patienten, der anfangs entweder ein nicht-reaktives oder ein schwach reaktives Ergebnis zeigte, eine rekonvaleszente Probe zu testen.

Erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien:

- Pipetten
- Spritzflasche mit enger Spitze
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser
- Probenverdünnungsröhrchen
- saugfähiges Tuch
- Mikrotiterplattenlesegerät mit Ablesung bei 450 und 620 - 650 nm

Passende Temperatur

Bei Raumtemperatur lang inkubieren (15-25 °C)

Prüfen Sie Verfahren

Hinweise:

- Achten Sie darauf, dass alle Proben und Reagenzien Raumtemperatur (15 - 25 °C) angenommen haben.
- Achten Sie beim Durchführen des Assays darauf, dass sich in den Wells keine Luftblasen bilden. Bläschen können die Leistung des Assays beeinträchtigen und das Testergebnis verfälschen. Durch Ausklopfen der Wells auf einem sauberen, saugfähigen Tuch nach jedem Waschschrift lassen sich Luftblasen in den Wells auf ein Mindestmaß begrenzen.
- Negative und positive Kontrollen werden vorverdünnt geliefert. NICHT weiter verdünnen.

1. Brechen Sie die benötigte Anzahl Wells ab (zwei für die Kontrollen und eines für jede Probe) und setzen Sie sie in den Streifenhalter.
2. Geben Sie **100 µl** negative Kontrolle in Well 1, **100 µl** positive Kontrolle in Well 2 und **100 µl** der verdünnten (1:40) Proben in die verbliebenen Wells.
Negative und positive Kontrollen werden vorverdünnt geliefert. NICHT weiter verdünnen.
3. Bei Raumtemperatur **10 Minuten** lang inkubieren, dann waschen.* Klopfen Sie nach dem letzten Waschschrift die Wells auf einem sauberen, saugfähigen Tuch aus, um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen.
4. **2 Tropfen** Enzym-Konjugat zu jedem Well hinzufügen.
5. Bei Raumtemperatur **10 Minuten** lang inkubieren, dann waschen.* Klopfen Sie nach dem letzten Waschschrift die Wells auf einem sauberen, saugfähigen Tuch aus, um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen.
6. **2 Tropfen** Chromogen zu jedem Well hinzufügen.
7. Bei Raumtemperatur **5 Minuten** lang inkubieren.
8. **2 Tropfen** Stopplösung zu jedem Well hinzufügen. Den Inhalt der Wells vorsichtig mischen, indem Sie etwa **15 Sekunden** lang mit dem Zeigefinger an die Seite des Streifenhalters klopfen.
9. Das Ergebnis innerhalb von einer Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ablesen.

Zum Waschen werden die einzelnen Wells dreimal (Mal) nacheinander bis zum Überfließen kräftig gefüllt und dann ausgeleert. Vermeiden Sie möglichst die Bildung von Blasen in den Wells, da dies das Ergebnis beeinträchtigen könnte.

Lesen resultiert

Visuell: Betrachten Sie jedes Well vor einem weißen Hintergrund und notieren Sie, ob die Farbe klar ist bzw. eine Reaktion der Stärke +, ++ oder +++ vorliegt.

Stellen Sie den Nullpunkt des ELISA-Readers mit Luft auf Null, messen Sie die Absorption in den Wells bei 450 nm mit einem Referenzfilter bei 620 - 650 nm

Qualitätskontrolle

Die Verwendung von Kontrollen ermöglicht eine Überprüfung der Stabilität des Kits. Der Kit sollte nicht verwendet werden, wenn eine der Kontrollen außerhalb des entsprechenden Bereichs liegt.

Die für die Kontrollen erwarteten Werte sind:

Negativ: 0.00 - 0.03 OD-Einheiten.

Positiv: Über 0.5 OD-Einheiten

Fehlerbehebung:

Die negative Kontrolle zeigt nach dem Entwickeln eine starke Farbreaktion.

Ursache: ungenügendes Waschen.

Abhilfemaßnahme: intensiveres Waschen Entfernen überschüssiger Flüssigkeit aus den Wells durch Ausklopfen auf einem saugfähigen Tuch. Lassen Sie die Wells nicht austrocknen.

Interpretation der ergebnisse

Anfangs nicht reaktiv: Nicht-Reaktivität einer Probe (0,0 - 0,3 OD-Einheiten bzw. keine Farbreaktion) zeigt an, dass in der Probe kein Antikörper vorliegt. Da in den frühen Phasen einer Erkrankung (nach 5 - 8 Tagen Inkubationszeit) möglicherweise noch kein Antikörper vorhanden ist, muss die Labordiagnose 2 - 3 Wochen später bestätigt werden. Bei Patienten, die zu diesem späteren Zeitpunkt eine schwache Reaktion (0,3-1,0 OD oder +, ++ zeigen, müssen weitere Tests mit anderen Methoden durchgeführt werden, oder dieser Test muss 10 - 14 Tage später wiederholt werden. Eine signifikante Reaktion (> 1,0 OD) in einem rekonvaleszenten Serum zeigt die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen Leptospira an. Ein anfangs negatives Ergebnis gefolgt von einem positiven Ergebnis deutet auf Serokonversion hin.

Anfangs schwach reaktiv: Schwach reaktive Proben müssen mit Vorsicht interpretiert werden. In normalen Populationen sind schwach reaktive Proben selten, aber möglich. Eine Bestätigung anhand einer 2 - 3 Wochen später abgenommenen Probe (gepaartes akutes und rekonvaleszentes Serum) ist empfehlenswert. Ein OD-Wert > 1,0 in der zweiten Probe bestätigt das Vorliegen kürzlich gebildeter, spezifischer Antikörper. [Vorsicht: Wenn es sich um einen kreuzreaktiven Antikörper handelt, lässt sich im rekonvaleszenten Serum u. U. kein höherer Antikörperspiegel als in der akuten Probe nachweisen.] Wenn die Probe weiterhin ein Resultat von 0,3 - 1,0 OD oder +, ++ ergibt, sollte eine zweite Testmethode erwogen werden, oder die Probe kann als eine nach dem Titeranstieg (bei abnehmenden Titer) genommene Probe interpretiert werden.

Anfangs reaktiv: Als stark reaktiv (> 1,0 OD oder +++) interpretierte Proben können auf das Vorliegen von spezifischen Antikörpern hinweisen. Das Vorliegen von Antikörpern allein darf nicht als Kriterium für die Diagnose einer akuten Infektion verwendet werden, da Antikörper, die sich während einer vorangegangenen Exposition gebildet haben, noch längere Zeit im Blut zirkulieren können.

Grenzen des testverfahrens:

Serologische Resultate sollen die Diagnose unterstützen, dürfen aber nicht als alleinige Methode zur Diagnosestellung eingesetzt werden.

Den Assay nicht für tierärztliche Proben verwenden.

Häufig ist vor der Durchführung einer serologischen Diagnose eine Behandlung angezeigt, die mindestens zwei Wochen in Anspruch nimmt. Akute Leptospirose muss sofort behandelt werden, und die serologische Bestätigung sollte nicht abgewartet werden. Die Diagnose einer Leptospira-Infektion sollte nicht allein auf der Grundlage eines ELISA-Tests erfolgen, sondern ausschließlich im Zusammenhang mit weiteren klinischen Anzeichen und Symptomen bzw. Laborergebnissen.

Epidemiologische Faktoren, klinische Befunde, Aufenthalt in endemischen Regionen und weitere Laborergebnisse müssen bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden.

Von Leptospira sind eine Vielzahl von Stämmen und Serovaren bekannt. Viele Stämme sind in bestimmten geografischen Regionen dominant, in anderen dagegen nicht. Von L. Biflexa Patoc 1 ist bekannt, dass er mit den meisten Serovaren kreuzreagiert, **normalerweise jedoch nicht mit Tierstämmen**. Die relative Stärke der Reaktion kann mit dem Antigen variieren. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Das Anlegen einer Kultur oder ein MAT zur Bestätigung wird empfohlen, da diese Tests serovaren-spezifisch sind.

Da serologiche Testmethoden bei schwach reaktiven Proben unterschiedliche Ergebnisse liefern können, wird die Verwendung einer zweiten serologischen Methode (d. h. eine alternative Methode, mit der IgM- und IgG-Antikörper separat nachgewiesen werden können) empfohlen.

Erwartete Werte

Die Anzahl antikörper-positiver Personen in einer Population hängt von zwei Faktoren ab: von der Prävalenz der Erkrankung sowie von den klinischen Kriterien, die bei der Auswahl der Testpopulation angelegt wurden. Da in einer zufällig gescreenten Population in einem nicht-endemischen Gebiet nur wenige Positive gefunden werden dürften, sind die meisten serologischen Tests nicht spezifisch genug, um ein Screening einer Population in einem nicht-endemischen Gebiet durchzuführen. Selbst in einer endemischen Region ergibt ein zufälliges serologisches Screening viele falsch-positive Resultate. Serologische Tests sind sinnvoll zum Testen von Patienten aus endemischen Gebieten, bei denen die klinischen Symptome mit der Erkrankung im Einklang stehen.

Im Frühstadium der Infektion sind die Antikörperspiegel generell niedrig, oder es sind keine Antikörper nachweisbar. Symptomatische Patient weisen u. U. innerhalb der ersten 1 - 2 Wochen nach Exposition keine Antikörper auf, und der Antikörpertiter steigt erst mit der Zeit an.

Leistungskennzeichen

| | | Darauf verweisen Methode * | |
|---------|---|----------------------------|----|
| | | + | - |
| SCIMEDX | + | 8 | 4 |
| | - | 2 | 28 |

Positives Abkommen: 80% (8/10)

Negatives Abkommen: 87.5% (28/32)

*Verweisung Methode sich bezieht auf einen gewerblich verfügbaren ELISA

L'italiano

Per uso diagnostico in vitro.

Reagenti:

| Item | Description | Symbol |
|-------------------------------|--|------------------|
| Micropiastra | Una micropiastra (12 X 8 pozzetti staccabili) rivestita con l' antigene di leptospira | MT PLATE |
| Coniugato Enzimatico | 1 bottiglia 11ml IgG anti-essere umano ha coniugato al peroxidase. | CONJ |
| Controllo Positivo | 1 flacone 2 ml Il siero diluito surrogato. | CONTROL + |
| Controllo Negativo | 1 flacone 2 ml siero diluito, negativo umano. | CONTROL - |
| Cromogeno | 1 bottiglia 11 ml cromogeno di tetrametilbenzidina (TMB). | SUBS TMB |
| Concentrato di Lavaggio (20X) | 1 bottiglia 25 ml Il tampone concentrati ed il surfactant. | WASH BUF |
| Tampone di Diluizione | 2 bottiglie 30 ml Soluzione di proteina di buffered. | SPECM DIL |
| Soluzione di Arresto | 1 bottiglia 11 ml 0.73 M acido fosforico. | SOLN |

Precauzioni:

- **Nell'eseguire l'analisi non deviare dalle procedure specificate.** Tutte le diluizioni dei campioni, i tempi e le temperature di incubazione e i lavaggi sono stati ottimizzati per le migliori caratteristiche di rendimento. Eventuali deviazioni dalle procedure specificate potrebbero influire sulla sensibilità e sulla specificità dell'analisi.
- Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non interscambiare reagenti appartenenti a kit con numeri di lotto differenti.
- Non usare reagenti scaduti. La data di scadenza è riportata sull'etichetta di ciascun reagente. L'uso di reagenti scaduti potrebbe influire sui risultati.
- I micropozzetti inutilizzati vanno riposti nella busta contenente essiccante per proteggerli dall'umidità.
- Non usare soluzioni precipitate o che appaiono torbide. Il concentrato di lavaggio potrebbe esibire cristallizzazione se conservato a 2 – 8 °C. La cristallizzazione scompare dopo la diluizione alla concentrazione di lavoro.
- Non aggiungere azidi ai campioni o ad alcuno dei reagenti.
- I controlli ed alcuni reagenti contengono Thimerosal come conservante, Quale potrebbe irritare per sbucciare, gli occhi e le mucose. In caso di contatto, in caso di occhi di flusso o la risciacquata sbucciano con gli ammontare abbondanti di acqua.
- Non usare siero suscettibile di avere flora microbica o con un aspetto torbido a causa dell'alto contenuto di lipidi. I campioni con contenuto elevato di lipidi vanno chiarificati prima dell'uso.

- Trattare tutti i sieri come se fossero infetti. I controlli sono stati analizzati con le metodiche di analisi previste e sono risultati negativi per l'antigene di superficie dell'epatite B e gli anticorpi dell'HIV. Il presente prodotto va usato nelle condizioni di sicurezza considerate idonee per qualsiasi agente potenzialmente infetto.
- La soluzione di arresto è una soluzione al 5% di acido fosforico in acqua. In caso di versamento sulla cute, lavare con copiose quantità di acqua. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, lavare con copiose quantità di acqua e richiedere assistenza medica.
- I daltonici e gli ipovedenti potrebbero non essere in grado di leggere visivamente il test e pertanto per l'interpretazione dei risultati dovranno basarsi sui valori rilevati mediante spettrofotometria.

Condizioni di conservazione

Reagenti, strisce reattive e componenti contenuti in flaconi: conservare alla temperatura di 2 – 8 °C.

La bottiglia comprimibile contenente tampone di lavaggio diluito può essere conservata a temperatura ambiente.

Preparazione

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (15 – 25 °C) e miscelare.
- Il concentrato di lavaggio (20X) potrebbe precipitare durante la conservazione in frigorifero, ma tornerà in soluzione quando riportato alla temperatura ambiente e miscelato. **Accertarsi che il concentrato di lavaggio (20X) sia completamente in soluzione prima di diluirlo alla concentrazione di lavoro.** Per diluire il concentrato di lavaggio (20X) alla diluizione di lavoro, togliere il tappo e versare il contenuto di un flacone di concentrato di lavaggio in una bottiglia comprimibile contenente 475 ml di acqua deionizzata. Miscelare agitando con movimenti circolari. La bottiglia comprimibile deve avere una punta stretta per ottimizzare i lavaggi.

Prelievo dei campioni

L'analisi va eseguita con siero. Il siero può essere conservato a 2 – 8 °C per un massimo di cinque giorni. Il siero può essere congelato a temperature inferiori a -20 °C per periodi prolungati. Non riscaldare campioni inattivati ed evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

Per valutare l'esposizione vengono usati campioni singoli; per rilevare la sierconversione si usano due campioni prelevati in tempi diversi dallo stesso individuo. **I campioni in coppia vanno analizzati allo stesso momento.** Si consiglia di prelevare un campione in fase convalescente dai pazienti che mostrano un risultato inizialmente non reattivo o un risultato blandamente reattivo.

Materiali richiesti ma non in dotazione

Pipette
bottiglia comprimibile con punta stretta
Acqua distillata o deionizzata in vetro
provette per le diluizioni
un panno assorbente
Lettore per strisce di micropozzetti in grado di leggere a lunghezze d'onda di 450 & 620-650 nm

Temperatura propria

Incubare a temperatura ambiente per (15-25 °C).

Procedura:

Note:

- Accertarsi che tutti i campioni e i reagenti siano a temperatura ambiente (15 – 25 °C).
 - Quando si esegue l'analisi, cercare di evitare la formazione di bolle nei pozzetti. Le bolle possono influire sulle prestazioni generali e sui risultati dell'analisi. Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle nei pozzetti, si consiglia di batterli su un panno assorbente pulito.
 - I controlli negativo e positivo sono forniti prediluiti. NON diluirli ulteriormente.
1. Separare il numero di pozzetti necessario (due per i controlli oltre al numero di campioni) e posarli nell'apposito supporto.
 2. Dispensare **100 µl** di controllo negativo nel pozzetto n. 1, **100 µl** di controllo positivo nel pozzetto n. 2 e **100 µl** dei campioni di analisi diluiti (1:40) nei pozzetti rimanenti. I controlli negativo e positivo sono forniti prediluiti. NON diluirli ulteriormente.
 3. Incubare a temperatura ambiente per **10 minuti**, quindi lavare.* Dopo l'ultima fase di lavaggio, battere i pozzetti su un panno assorbente pulito per asportare il tampone di lavaggio in eccesso.
 4. Aggiungere **2 gocce** di coniugato enzimatico in ciascun pozzetto.
 5. Incubare a temperatura ambiente per **10 minuti**, quindi lavare.* Dopo l'ultima fase di lavaggio, battere i pozzetti su un panno assorbente pulito per asportare il tampone di lavaggio in eccesso.
 6. Aggiungere **2 gocce** di cromogeno in ciascun pozzetto.
 7. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
 8. Aggiungere **2 gocce** di soluzione di arresto in ciascun pozzetto. Miscelare i pozzetti battendo leggermente il lato del supporto con il dito indice per circa **15 secondi**.
 9. Leggere i risultati entro un'ora dopo aver aggiunto la soluzione di arresto.

Nota: i lavaggi consistono nel riempire fino in alto i pozzetti, gettare via il contenuto e riempire di nuovo. Durante le fasi di lavaggio evitare di creare bolle nei pozzetti.

Lettura risulta

Visivamente: Osservare ciascun pozzetto contro uno sfondo bianco e registrare un risultato trasparente o una reazione +, ++ o +++.

Lettore ELISA: Azzerare il lettore ELISA rispetto all'aria, leggere i pozzetti a 450 nm con un filtro di riferimento a 620-650 nm o leggere i risultati.

Controllo di qualità

L'uso dei controlli consente la convalida della stabilità del kit. Il kit non va usato se uno o più controlli non rientrano nei limiti.

I valori previsti per i controlli sono:
Negativo: 0.0 – 0.3 unità OD
Positivo: 0.5 unità OD e superiori

Risoluzione dei problemi:

il controllo negativo presenta una colorazione eccessiva dopo lo sviluppo.

Motivo: lavaggi inadeguati.

Correzione: lavare più vigorosamente. Eliminare dai pozzetti il liquido in eccesso battendo contro un panno assorbente.
Non lasciare seccare i pozzetti di analisi.

Interpretazione dei risultati:

Inizialmente non reattivi: i campioni interpretati come non reattivi (0,0-0,3 unità OD, o assenza di colorazione) indicano che l'anticorpo non è presente nel campione. Dato che l'anticorpo potrebbe non essere presente durante le prime fasi della malattia (5-8 giorni di incubazione), per la diagnosi di laboratorio è indicato eseguire un esame di conferma a distanza di 2-3 settimane. In questo secondo tempo, i pazienti che hanno esibito reazioni blande (0,3-1,0 OD o +, ++), vanno sottoposti ad accertamenti mediante altre metodiche oppure risottoposti a questo test a distanza di 10-14 giorni. Un siero in fase convalescente con una reazione significativa (>1,0 OD) indica la formazione di specifici anticorpi anti-leptospira. Un risultato inizialmente negativo seguito da un risultato positivo implica sierconversione.

Inizialmente blandamente reattivi: i campioni blandamente reattivi devono essere interpretati con prudenza. Nelle popolazioni normali, i campioni blandamente reattivi sono infrequenti ma possibili. Si consiglia di ottenere conferma utilizzando un campione prelevato 2-3 settimane più tardi (siero in fase acuta e siero in fase convalescente in coppia). Un valore >1,0 OD nel secondo campione conferma la presenza di anticorpi specifici recenti. [Attenzione - Se si tratta di un anticorpo con reattività crociata, il campione di siero in fase convalescente potrebbe non evidenziare un livello anticorpale superiore al campione in fase acuta.] Se il valore rilevato nel campione rimane a 0,3-1,0 OD, o +, ++, prendere in considerazione l'opportunità di utilizzare una metodica diversa, oppure il campione potrebbe essere interpretato come prelevato successivamente all'aumento del titolo anticorpale (declino del titolo).

Inizialmente reattivi: i campioni interpretati come fortemente reattivi (>1,0 OD o +++) potrebbero indicare la presenza di anticorpi specifici. La sola presenza di anticorpi non può essere considerata per formulare la diagnosi di infezione acuta, dato che gli anticorpi da precedente esposizione possono circolare per un periodo prolungato di tempo.

Limitazioni delle procedure:

I risultati sierologici costituiscono un ausilio alla diagnosi, ma non possono essere usati come unico metodo di diagnosi.

Non usare in campioni veterinari.

Un trattamento è spesso indicato prima del completamento della diagnosi sierologica, che richiede almeno due settimane. La leptospirosi acuta va trattata immediatamente, senza attendere la conferma sierologica. La diagnosi di infezione da leptospira non deve essere formulata basandosi esclusivamente sui risultati dell'analisi ELISA, ma unitamente ad altri segni e sintomi clinici e altri reperti di laboratorio.

Per la formulazione della diagnosi si devono tenere in considerazione fattori epidemiologici, reperti clinici, esposizione a regioni endemiche e altri risultati di laboratorio.

Sono noti molti ceppi e sierovarianti di leptospira. Molti dei ceppi sono dominanti geograficamente in determinate aree e non in altre. È noto che Biflexa Patoc 1 presenta reattività crociata con la maggioranza delle sierovarianti, **ma normalmente non presenta alcuna reattività crociata con i ceppi animali**. L'intensità relativa delle reazioni può variare in rapporto all'antigene in questione. Questo fattore deve essere tenuto presente al momento dell'interpretazione dei risultati. A titolo di conferma si consiglia di eseguire una coltura o il test MAT, poiché questi test sono specifici per ogni sierovariante.

Dato che i metodi di dosaggio sierologico possono dare risultati differenti con campioni blandamente reattivi, si consiglia di usare un secondo metodo sierologico (ovvero un metodo alternativo che identifichi separatamente gli anticorpi IgM e IgG).

Valori aspettati

Il numero di soggetti positivi agli anticorpi in una popolazione dipende da due fattori: la prevalenza della malattia e i criteri clinici usati per selezionare la popolazione analizzata. Dato che in una popolazione selezionata a caso per un'indagine di massa in un'area non endemica si dovrebbero ottenere pochissimi risultati positivi, la maggioranza dei test sierologici non hanno sufficiente specificità per lo screening di popolazioni non endemiche. Persino in una regione endemica, lo screening sierologico spesso dà molti falsi positivi se usato per lo screening casuale dei pazienti. Le analisi sierologiche risultano utili per sottoporre a un controllo i pazienti in una regione endemica con segni e sintomi coerenti con la malattia.

I livelli anticorpali sono generalmente bassi o assenti durante i primissimi stadi dell'infezione. I pazienti sintomatici potrebbero non presentare anticorpi durante le prime 1-2 settimane dopo l'esposizione e il titolo anticorpale si innalzerà con il tempo.

Caratteristiche di rendimento

| | | Metodo di riferimento * | |
|---------|---|-------------------------|----|
| | | + | - |
| SCIMEDX | + | 8 | 4 |
| | - | 2 | 28 |

Accordo positivo: 80% (8/10)

L'Accordo negativo: 87.5% (28/32)

* Metodo di riferimento fa riferimento a un ELISA commercialmente disponibile

El español

Sólo para uso en diagnóstico in vitro.

Reactivos:

| Item | Description | Symbol |
|------------|--|-----------------|
| Microplaca | Una microplaca (12 X 8 pocillos separables) revestida con antígeno de leptospira | MT PLATE |

| | | |
|---|--|------------------|
| Conjugado Enzimático | 1 Recipiente 11ml IgG anti humano conjugó al peroxidase. | CONJ |
| Control Positivo | 1 Recipiente 2 ml suero sustituto y diluido | CONTROL + |
| Control Negativo | 1 Recipiente 2 ml suero humano, negativo y diluido. | CONTROL - |
| Chromogen | 1 Recipiente 11 ml chromogen tetrametilbenzidina (TMB). | SUBS TMB |
| El Concentrado Para Lavado (20X) | 1 Recipiente 25 ml búfer y surfactant concentrados. | WASH BUF |
| De Solución Amortiguadora Para Dilución | 2 Recipientes 30 ml de solución amortiguadora de proteína. | SPECM DIL |
| Solución Quelante | 1 Recipiente 11 ml 0.73 M ácido fosfórico | SOLN |

Precauciones:

- **No desviarse de los procedimientos especificados al realizar este ensayo.** Todas las diluciones de las muestras, los tiempos y las temperaturas de incubación y los lavados se han optimizado para tener las mejores características de rendimiento. Las desviaciones de los procedimientos especificados pueden afectar la sensibilidad y la especificidad de este ensayo.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro.
- No intercambiar reactivos entre kits con distintos números de lote.
- No utilizar reactivos que han pasado la fecha de caducidad. Las fechas de caducidad se encuentran en la etiqueta de cada reactivo. El uso de reactivos después de su fecha de caducidad puede afectar los resultados.
- Los micropocillos sin usar se deben almacenar en la bolsa desecante para protegerlos de la humedad.
- No utilizar soluciones que precipitan o se ponen turbias. El concentrado para lavado puede mostrar cristalización cuando se almacena a 2 – 8 °C. La cristalización desaparecerá después de la dilución hasta la potencia de trabajo.
- No agregar azidas a las muestras ni a ninguno de los reactivos.
- Los controles y algunos reactivos contienen Thimerosal como conservante, cuál puede estar irritando para pelar, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, ojos o aclarado parejos pelan con cantidades copiosas de agua.
- No usar suero que pueda haber tenido crecimiento microbiano o que se encuentre turbio debido a un alto contenido lipídico. Las muestras con altos contenidos de lípidos se deben clarificar antes de usar.
- Tratar todo el suero como si pudiera ser infeccioso. Los controles se han analizado por medio de los métodos de prueba requeridos y se ha encontrado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anticuerpo contra el VIH. Este producto se debe usar bajo las condiciones adecuadas de seguridad que se usarían con cualquier agente potencialmente infeccioso.
- La solución quelante es una solución de ácido fosfórico en agua al 5%. Si salpica la piel, lavar con abundante cantidad de agua. Si el ácido entra en contacto con los ojos, lavar con abundante cantidad de agua y buscar asistencia médica.
- Es posible que las personas que no distinguen los colores o que tienen deficiencias visuales no puedan leer visualmente la prueba y deban usar lecturas espectrofotométricas para interpretar los resultados.

Condiciones de Almacenamiento

- Reactivos, tiras reactivas y componentes en frascos: Almacenar entre 2 – 8 °C.
- La botella comprimible que contiene la solución amortiguadora para lavado se puede almacenar a temperatura ambiente.

Preparación de Los Reactivos:

- Antes de usar, llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (15 – 25 °C) y mezclar.
- El concentrado para lavado (20X) puede precipitar durante el almacenamiento refrigerado, pero volverá a su estado de solución cuando regrese a temperatura ambiente y se mezcle. **Asegurarse de que el concentrado para lavado (20X) sea completamente una solución antes de diluir a la concentración de trabajo.** Para diluir el concentrado para lavado (20X) hasta la dilución de trabajo, retirar la tapa y agregar el contenido de una botella de concentrado para lavado en una botella comprimible que contenga 475 ml de agua desionizada. Girar para mezclar. La botella comprimible debe tener una punta estrecha para optimizar los lavados.

Toma de Muestras:

La prueba se debe realizar en suero. El suero se puede almacenar a 2 – 8 °C hasta durante cinco días. El suero se puede congelar a temperaturas inferiores a -20 °C durante períodos prolongados. No calentar muestras inactivas y evitar la congelación y la descongelación repetidas de las muestras.

Se utilizan muestras individuales para evaluar la exposición; para mostrar la seroconversión se usan dos muestras recogidas de una misma persona en diferentes momentos. **Las muestras pareadas se deben analizar al mismo tiempo.** Se recomienda que se tome una muestra convaleciente de los pacientes que tienen un resultado inicial no reactivo o un resultado reactivo débil.

Materiales necesarios pero no suministrados:

- Pipetas
- Botella comprimible con una abertura de punta estrecha.
- Agua destilada o desionizada.
- Tubos para dilución de muestras
- Toalla absorbente limpia
- Lector ELISA con a 450 nm con un filtro de referencia a 620-650

Proper Temperature

All incubations are at room temperature (15-25 °C)

Temperatura apropiada

Notas:

- Asegurarse de que todas las muestras y los reactivos estén a temperatura ambiente (15 – 25 °C)
 - Cuando se realice el ensayo, evitar la formación de burbujas en los pocillos. Las burbujas pueden afectar al rendimiento general y a la lectura de los resultados finales. Golpear los pocillos sobre una toalla absorbente limpia después de cada paso puede ayudar a minimizar las burbujas.
 - Los controles negativos y positivos se suministran prediluidos. NO diluir más.
1. Cortar la cantidad de pocillos necesarios (dos para los controles más el número de muestras) y colocarlos en el soporte.
 2. Agregar **100 µl** de control negativo al pocillo N° 1, **100 µl** de control positivo al pocillo N° 2 y **100 µl** de las muestras de prueba diluidas (1:40) a los pocillos restantes.
Los controles negativos y positivos se suministran prediluidos. NO diluir más.
 3. Incubar a temperatura ambiente durante **10 minutos**, luego lavar.* Después del último paso de lavado, golpear los pocillos sobre una toalla absorbente limpia para eliminar el exceso de solución amortiguadora para lavado
 4. Agregar **2 gotas** de conjugado enzimático en cada pocillo.
 5. Incubar a temperatura ambiente durante **10 minutos**, luego lavar.* Después del último paso de lavado, golpear los pocillos sobre una toalla absorbente limpia para eliminar el exceso de solución amortiguadora para lavado
 6. Agregar **2 gotas** de Chromogen en cada pocillo.
 7. Incubar a temperatura ambiente durante **5 minutos**
 8. Agregar **2 gotas** de solución quelante en cada pocillo.
 9. Mezclar los pocillos golpeando suavemente el lado del soporte con el dedo índice durante aproximadamente **15 segundos**.
 10. Leer antes de una hora de agregar la solución quelante.

* Los lavados consisten en llenar vigorosamente cada pocillo hasta el nivel máximo y decantar el contenido tres (3) veces separadas. Cuando sea posible, evitar la formación de burbujas en los pocillos, ya que eso puede afectar a los resultados finales.

Leer resulta

Visualmente: Observar cada pocillo contra un fondo blanco y registrar como transparente o como reacción +, ++ ó +++.

Lector ELISA: Poner a cero el lector ELISA con aire, leer los pocillos a 450 nm con un filtro de referencia a 620-650 nm o leer los resultados.

Control de calidad

El uso de controles permite la validación de la estabilidad del kit. El kit no se debe usar si alguno de los controles se encuentra fuera de rango.

Los valores esperados para los controles son:

Negativo: 0.0 – 0.3 Unidades OD

Positivo: 0.5 Unidades OD y más

Resolución de problemas:

El control negativo tiene un exceso de color después del desarrollo

Motivo: lavados insuficientes

Corrección: lavar más vigorosamente. Eliminar el exceso de líquido de los pocillos golpeando contra una toalla absorbente.

No dejar que los pocillos de prueba se sequen.

Interpretación de los resultados:

Inicialmente no reactivo: Las muestras que se interpretan como no reactivas (0,0-0,3 unidades OD, o color cero) indican que no hay anticuerpos presentes en la muestra. Debido a que los anticuerpos pueden no estar presentes durante las etapas tempranas de la enfermedad, (5-8 días de incubación), está indicado una confirmación 2-3 semanas más tarde para diagnóstico de laboratorio. En ese momento, los pacientes con reacciones débiles (0,3-1,0 OD ó +, ++ se deben volver a analizar con métodos alternativos o repetir las pruebas 10-14 días después. Un suero convaleciente con una reacción significativa (>1,0 OD) indica la formación de anticuerpos específicos contra la leptospira. Un resultado inicialmente negativo seguido de un resultado positivo implica seroconversión.

Inicialmente débilmente reactivo: Las muestras débilmente reactivas se deben interpretar con cautela. En poblaciones normales, las muestras débilmente reactivas son poco frecuentes, pero posibles. Se recomienda la confirmación utilizando una muestra recogida 2-3 semanas más tarde (suero agudo y convaleciente pareados). >1,0 OD en la segunda muestra confirma la presencia de un anticuerpo específico reciente. [Advertencia: Si se trata de un anticuerpo con reacción cruzada, la muestra de suero convaleciente puede no mostrar un nivel de anticuerpo más alto que la muestra aguda.] Si la lectura de la muestra permanece en 0,3-1,0 OD ó +, ++, se debe considerar el uso de una segunda metodología o se puede interpretar la muestra como tomada después de la titulación creciente (titulación decreciente).

Inicialmente reactivo: Las muestras que se interpretan como fuertemente reactivas (>1,0 OD ó ++++) pueden indicar la presencia de un anticuerpo específico. La presencia de un anticuerpo solo no se puede usar para el diagnóstico de una infección aguda, ya que anticuerpos de exposiciones anteriores pueden circular durante un período de tiempo prolongado.

Limitaciones

Los resultados serológicos son una ayuda, pero no se pueden usar como el único método de diagnóstico.

No usar en muestras veterinarias.

A menudo está indicado el tratamiento antes de completar los diagnósticos serológicos, lo que requiere al menos dos semanas. La leptospirosis aguda se debe tratar inmediatamente y no se debe esperar a la confirmación serológica. No se debe realizar el diagnóstico de una infección por leptospira sólo en base a los resultados de la prueba ELISA, sino conjuntamente con otros signos y síntomas clínicos y otros hallazgos de laboratorio.

Cuando se hace el diagnóstico, se deben considerar los factores epidemiológicos, los hallazgos clínicos, la exposición a regiones endémicas y otros resultados de laboratorio.

Se conocen muchas cepas y serovars de leptospira. Muchas de las cepas tienen dominancia geográfica en algunas áreas y no en otras. Se sabe que Biflexa Patoc 1 tiene reacción cruzada con la mayoría de las serovars, **pero por lo general no tiene reacciones cruzadas con cepas animales**. La potencia relativa de las reacciones puede variar según el antígeno. Esto se debe tener en cuenta durante la interpretación. Se recomienda el uso de cultivos o de la prueba MAT para la confirmación, ya que estas pruebas son serovar específicas.

Como los métodos de ensayo serológico pueden producir resultados distintos en las muestras débilmente reactivas, se recomienda un segundo método serológico (es decir, un método alternativo que identifique por separado los anticuerpos IgM e IgG).

Valores esperados

El número de sujetos con anticuerpos positivos en una población depende de dos factores: la prevalencia de la enfermedad y los criterios clínicos usados para seleccionar la población analizada. Debido a que se deberían observar muy pocos resultados positivos en una población seleccionada aleatoriamente en un área no endémica, la mayoría de las pruebas serológicas no son lo suficientemente específicas para seleccionar poblaciones no endémicas. Incluso en una región endémica, si la selección serológica se usa para seleccionar pacientes en forma aleatoria, suele producir muchos falsos positivos. Las pruebas serológicas son útiles para analizar pacientes en una región endémica con signos y síntomas compatibles con la enfermedad.

Los niveles de anticuerpos suelen ser bajos o estar ausentes durante las fases muy tempranas de la infección. Los pacientes sintomáticos no tienen anticuerpos durante las primeras 1-2 semanas después de la exposición, y la titulación de anticuerpos aumentará con el tiempo.

Características de rendimiento

| | | Método de referencia * | |
|---------|---|------------------------|----|
| | | + | - |
| SCIMEDX | + | 8 | 4 |
| | - | 2 | 28 |

Acuerdo positivo: 80% (8/10)

Acuerdo negativo: 87.5% (28/32)

*El Método de referencia se refiere a un ELISA disponible comercialmente.

Portuguese

Somente para utilização em diagnóstico in vitro.

Reagentes

| Item | Description | Symbol |
|------------------------------|--|------------------|
| Micropoços de ELISA | 96 micropoços com leptospira antige | MT PLATE |
| Conjugado Enzimático | (1) frasco 11ml O anti-ser humano IgG conjugou a peroxidase. | CONJ |
| Controlo Positivo | (1) frasco 2 ml Diluiu soro substituto | CONTROL + |
| Controlo Negativo | (1) frasco 2 ml Diluiu soro humano negativo. | CONTROL - |
| Cromogénio | (1) frasco 11 ml Cromogénio tetramethylbenzidine (TMB). | SUBS TMB |
| Concentrado de lavagem (20X) | (1) frasco 25 ml Buffer concentrado e surfactant. | WASH BUF |
| Tampão de diluição | (2) frascos 30 ml Amorteceu solução de proteína. | SPECM DIL |
| Solução de paragem | (1) frasco 11 ml 0.73 M Ácido de phosphoric. | SOLN |

Precauções

- **Durante a realização deste ensaio observar rigorosamente os procedimentos especificados.** Todas as diluições da amostra, tempos/temperaturas de incubação e lavagens foram otimizados para obter as melhores características de desempenho. Quaisquer desvios aos procedimentos especificados podem afectar a sensibilidade e a especificidade do ensaio.
- Somente para utilização em diagnóstico in vitro.
- Não trocar os reagentes entre kits com números de lote diferentes.
- Não usar reagentes que não se encontrem dentro do prazo de validade. A validade está indicada em todos os rótulos dos reagentes. A utilização de reagentes fora do prazo de validade pode afectar os resultados.
- Os micropoços não usados devem ser armazenados na bolsa seca para os proteger da humidade
- Não usar soluções se precipitarem ou ficarem turvas. O concentrado de lavagem pode apresentar cristalização quando armazenado a 2 – 8 °C. A cristalização desaparece após a diluição para a concentração final.
- Não adicionar azidas às amostras ou a qualquer um dos reagentes.
- Os controlos e alguns reagentes contêm timerosal como conservante, que podem estar irritando-se esfoliar, olhos e membranas mucosas. Em caso de contacto, olhos nivelados ou enxaguam pele com quantias copiosas de água.
- Não usar soro que possa ter sustentado crescimento microbiano ou que esteja turvo devido ao seu elevado teor lipídico. As amostras com um elevado teor lipídico devem ser clarificadas antes da sua utilização.

- Tratar todos os soros como podendo ser infecciosos. Os controlos foram testados e considerados como negativos quanto ao antigénio de superfície da hepatite B e quanto ao anticorpo contra o VIH segundo os métodos requeridos. Este produto deve ser usado em condições de segurança apropriadas, utilizadas para qualquer agente potencialmente infeccioso.
- A solução de paragem é uma solução a 5% de ácido fosfórico em água. Se derramado sobre a pele, lavar abundantemente com água. Se o ácido entrar em contacto com os olhos, lavar abundantemente com água e consultar um médico.
- As pessoas daltónicas ou com deficiência visual podem não ser capazes de ler visualmente o teste e devem recorrer a leituras espectrofotométricas para interpretar os resultados.

Condições de armazenamento

- Reagentes, tiras e componentes engarrafados: armazenar entre 2 – 8 °C.
- A garrafa compressível e que contém o tampão de lavagem diluído pode ser armazenada à temperatura ambiente.

Preparação

- Antes de utilizar, deixar todos os reagentes e amostras alcançarem a temperatura ambiente (15 – 25 °C) e misturar.
- O concentrado de lavagem (20X) pode precipitar durante a refrigeração, mas regressará ao estado líquido quando atingir novamente a temperatura ambiente e for misturado. **Assegurar que o concentrado de lavagem (20X) está totalmente transformado em solução antes da diluição para a concentração final.** Para diluir o concentrado de lavagem (20X) para a diluição final, retirar a tampa e adicionar o conteúdo de uma garrafa de concentrado de lavagem a uma garrafa que possa ser apertada contendo 475 ml de água destilada. Agitar para misturar. A garrafa compressível deve dispor de uma ponta estreita para otimizar as lavagens.

Colheita e preparação de soro

Um teste deve ser realizado em soro. O soro pode ser armazenado a 2 – 8 °C durante até cinco dias. O soro pode ser congelado a uma temperatura inferior a -20 °C durante períodos prolongados. Não inactivar amostras pelo calor e evitar congelar e descongelar repetidamente as amostras.

A exposição é avaliada usando amostras individuais; duas amostras recolhidas em momentos diferentes do mesmo indivíduo são utilizadas para verificar a seroconversão. **As amostras emparelhadas devem ser testadas ao mesmo tempo.** Recomenda-se que seja recolhida uma amostra de doentes em fase de convalvescência que apresentem um resultado inicialmente não reactivo ou um resultado reactivo fraco.

Materiais adicionais necessários

Pipetas
 Garrafa compressível com uma abertura estreita
 Água de nível de reagent
 Tubos de diluições
 Toalha absorvente

Materiais sugeridos

Leitor ELISA com um 450 nm e um 620 a 650 nm filtra (opcional se resultados são lidos visualmente)

Temperatura adequada

Incubar à temperatura ambiente (15-25 °C)

Procedimento

Notas:

- Assegurar que todas as amostras e reagentes se encontram à temperatura ambiente (15 – 25 °C).
- Quando executar o ensaio, tentar evitar a formação de bolhas nos poços. As bolhas podem afectar o desempenho geral e a leitura dos resultados finais. Bater levemente com os poços sobre uma toalha absorvente limpa depois de cada etapa deve ajudar a minimizar a formação de bolhas nos poços.
- Os controlos negativos e positivos são fornecidos pré-diluídos. **NÃO diluir mais.**
 1. Separar o número de poços necessários (dois para controlos mais o número de amostras) e colocar no suporte de tiras.
 2. Adicionar **100 µl** de controlo negativo ao poço n.º 1, **100 µl** de controlo positivo ao poço n.º 2 e **100 µl** das amostras de teste diluídas (1:40) aos poços restantes.

Os controlos negativos e positivos são fornecidos pré-diluídos. **NÃO diluir mais.**
 3. Incubar à temperatura ambiente durante **10 minutos** e depois lavar.* Depois da fase de lavagem, bater levemente com os poços sobre uma toalha absorvente limpa para remover o excesso de tampão de lavagem.
 4. Adicionar **2 gotas** de conjugado enzimático a cada poço.
 5. Incubar à temperatura ambiente durante **10 minutos** e depois lavar.* Depois da fase de lavagem, bater levemente com os poços sobre uma toalha absorvente limpa para remover o excesso de tampão de lavagem.
 6. Adicionar **2 gotas** de cromogénio a cada poço.
 7. Incubar à temperatura ambiente durante **5 minutos**
 8. Adicionar **2 gotas** de solução de paragem a cada poço. Misturar os poços batendo levemente no lado do suporte de tiras com o dedo indicador durante aproximadamente **15 segundos**.
 9. Realizar a leitura uma hora depois de adicionar a solução de paragem.

* As lavagens consistem em encher vigorosamente cada poço até transbordar e decantar o conteúdo três (3) vezes em separado. Quando possível, evitar a formação de bolhas nos poços, uma vez que tal pode afectar os resultados finais.

Leitura resulta

Visualmente: Observar cada poço contra um fundo branco e registar uma reacção clara, +, ++ ou +++.

Leitor ELISA: Zero usando ar, realizar uma leitura dos poços a 450 nm com um filtro de referência a 620-650 nm ou ler os resultados.

Controlo de qualidade

A utilização de controlos permite a validação da estabilidade do kit. O kit não deve ser utilizado se algum dos controlos estiver fora do intervalo de valores.

Os valores esperados dos controlos são:

Negativo: 0.0 – 0.3 unidades DO.

Positivo: 0.5 unidades DO e superior.

Resolução de problemas:

o controlo negativo apresenta uma cor excessiva após o desenvolvimento.

Causa: lavagens inadequadas.

Correcção: lavar mais vigorosamente. Remover o excesso de líquido dos poços batendo levemente sobre uma toalha absorvente.

Não deixar que os poços de teste sequem.

Interpretação de prova

Inicialmente não reactiva: As amostras interpretadas como não reactivas (0,0-0,3 unidades DO ou ausência de cor) indicam a ausência de anticorpo na amostra. Uma vez que o anticorpo pode não estar presente na fase inicial da doença (incubação de 5-8 dias), recomenda-se a confirmação 2-3 semanas mais tarde para diagnóstico em laboratório. Nesta fase posterior, os doentes que apresentem reacções fracas (0,3-1,0 DO ou +, ++) devem voltar a ser testados por métodos alternativos ou novamente testados 10-14 dias mais tarde. Um soro de um doente em fase de convalescência com uma reacção significativa (>1,0 DO) indica a formação de anticorpo específico contra a leptospira. Um resultado inicialmente negativo seguido por um resultado positivo implica seroconversão.

Inicialmente pouco reactiva: Amostras com uma resposta pouco reactiva devem ser interpretadas com precaução. Nas populações normais, as amostras pouco reactivas são pouco frequentes mas possíveis. Recomenda-se a confirmação usando uma amostra recolhida 2-3 semanas mais tarde (soro combinado da fase aguda e da fase de convalescência). >1,0 DO na segunda amostra confirma a presença de anticorpo recente e específico.

[Precaução: Se se tratar de um anticorpo de reacção cruzada, a amostra de soro do doente convalescente pode não apresentar um nível de anticorpo superior ao da amostra em fase aguda.] Se a leitura da amostra se mantiver em 0,3-1,0 DO, + ou ++, deverá considerar-se uma segunda metodologia ou a amostra pode ser interpretada como tendo sido recolhida para além do aumento do título (título em declínio).

Inicialmente reactiva: As amostras interpretadas como fortemente reactivas (>1,0 DO ou +++) podem indicar a presença de um anticorpo específico. A presença de anticorpo, isoladamente, não pode ser utilizada para diagnóstico de uma infecção aguda, uma vez que os anticorpos da exposição anterior podem circular durante um período de tempo prolongado.

Limitações

Os resultados serológicos são uma ajuda para o diagnóstico, mas não podem ser utilizados como o único método de diagnóstico.

Não utilizar amostras veterinárias.

O tratamento é com frequência indicado antes da conclusão do diagnóstico serológico, o que requer pelo menos duas semanas. A leptospirose aguda tem de ser imediatamente tratada e não se deve aguardar pela confirmação serológica. O diagnóstico de infecção por leptospira não deve ser realizado somente com base nos resultados do teste ELISA, mas em combinação com outros sinais e sintomas clínicos e outras análises laboratoriais.

Factores epidemiológicos, resultados clínicos, exposição a regiões endémicas e outros resultados laboratoriais podem ser considerados na elaboração do diagnóstico.

São conhecidas muitas estirpes e serotipos de leptospira. Muitas das estirpes são geograficamente dominantes nalgumas áreas e não noutras. Sabe-se que o Biflexa Patoc 1 apresenta reacção cruzada com a maioria dos serotipos, **mas normalmente não apresenta reacção cruzada com estirpes animais**. A intensidade relativa das reacções pode variar em função do antigénio. Tal tem de ser considerado durante a interpretação. Recomenda-se a utilização de cultura ou teste MAT como confirmação, uma vez que estes testes são específicos de serotipos.

Dado que os métodos de ensaios serológicos podem apresentar resultados diferentes para amostras pouco reactivas, recomenda-se um segundo método serológico (isto é, um método alternativo que identifique separadamente os anticorpos IgM e IgG).

Valores Esperados

O número de indivíduos positivos a anticorpos numa população depende de dois factores: a prevalência da doença e os critérios clínicos utilizados para seleccionar a população testada. Uma vez que se devem observar muito poucos positivos numa população monitorizada aleatoriamente numa área não endémica, a maioria dos testes serológicos não é suficientemente específica para monitorizar populações não endémicas. Mesmo numa região endémica, a monitorização serológica apresenta com frequência muitos falsos positivos se utilizar doentes monitorizados aleatoriamente. Os testes serológicos são úteis para testar doentes numa região endémica com sinais e sintomas consistentes com a doença.

Os níveis de anticorpos são em geral baixos ou ausentes durante a fase inicial da infecção. Os doentes sintomáticos podem não apresentar anticorpos durante as primeiras 1-2 semanas após a exposição e o título de anticorpos aumentará com o tempo.

Características de Desempenho

| | Método de referência * | |
|---------|------------------------|----|
| | + | - |
| SCIMEDX | 8 | 4 |
| | 2 | 28 |

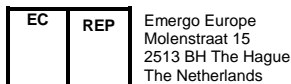
Acordo positivo: 80% (8/10)

Acordo negativo: 87.5% (28/32)

* Método de referência refere a um ELISA comercialmente disponível.

References

1. Kelly PW. Leptospirosis. In, Infectious disease in medicine and surgery. Gorbach S, Bartlett J, Balcklow N, (eds): Philadelphia, Saunders, 1991, pp.1295-1302.
2. Ribeiro MA, Assis CSN, Romero EC. Serodiagnosis of human leptospirosis employing immunodominant antigen. Serodiagn. Immunother. Infect. Disease 1994; 6:140-144.
3. Turner LH. Leptospirosis II. Trans. Royal Soc. Trop. Med. & Hygiene 1968; 62:880-889.
4. Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, et. al. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: Comparison with the microscopic agglutination test. Am J Trop Med Hyg 1985; 34(2):346-354.
5. Alder B, Murphy AM, Locarnini SA, et.al. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulin M and immunoglobulin G in human serum by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Micro 1980; 11:452-457.
6. Cinco M, Balanzini D, Banfi E. Evaluation of an immunoenzymatic test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis in Italy. Eur. J. Epidemiology 1992; 8:677-682.
7. Ribeiro MA, Sousa CC, Almeida SHP. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. J. Trop.Med. Hyg. 1995; 98:452-456.
8. Gussenhoven GC, van der Hoorn M, Goris M, et. al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J. Clin. Micro. 1997; 35(1):92-97.
9. Watt G, Alquiza LM, Padre LP, et. al. The rapid diagnosis of leptospirosis: A prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. J. Infect. Dis. 1988; 157(4):840-842.
10. Levett PN, Branch SL, Paxton H. Prospective Evaluation of Dot-ELISA Method for Detection of Acute Leptospirosis. Abstract of the 37th ICAAC (ASM) 1997; D-4: 83.



SCIMEDX CORPORATION
100 Ford Road
Denville, NJ 07834 USA
Tel: 800.221.5598 Tel: 973.625.8822
Fax: 973.625.8796
www.scimedx.com



In Vitro Diagnostic Medical Device
In-Vitro-Diagnostikum
Producto sanitario para diagnóstico in vitro
Dispositivo medico-diagnostico in vitro
Dispositif médical de diagnostic in vitro
Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
In Vitro diagnostický zdravotnícký prostriedek
Zdravotnícka pomôcka in vitro
In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό Προϊόν
Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
In vitro diagnosztikum
Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik
Wyrób do diagnostyki In Vitro



Contains sufficient for <n> tests
Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
Contenido suficiente para <n> ensayos
Contenuto sufficiente per "n" saggi
Contenu suffisant pour "n" tests
Inhoud voldoende voor "n" testen
Indeholder tilstrækkeligt til "n" test
Lze použít pro <n> testů
Obsah postačuje na <n> stanovení
Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
Conteúdo suficiente para "n" ensaios
A doboz tartalma <n> vizsgálat elvégzéséhez elegendő
Räcker till "n" antal tester
Wystarczy na wykonanie <n> testów



YYYY-MM

Use By
Verwendbar bis
Fecha de caducidad
Utilizzare entro
Utiliser jusque
Houdbaar tot
Holdbar til
Použitelné do
Použitelné do
Ημερομηνία λήξης
Prazo de validade
Felhasználható
Använd före
Użyć przed



Consult Instructions for Use-
Gebrauchsanweisung beachten
Consulte las instrucciones de uso
Consultare le istruzioni per l'uso
Consulter les instructions d'utilisation
Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
Se brugsanvisning
Viz návod k použití
Vid' návod na použitie
Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
Consulte as instruções de utilização
Nézze meg a Használati utasítást
Se handhavandebeskrivningen
Sprawdź w instrukcji obsługi



Catalogue number
Bestellnummer
Número de catálogo
Numero di catalogo
Référence du catalogue
Catalogus nummer
Katalognummer
Katalogové číslo
Κατάλογος αριθμός
Αριθμός καταλόγου
Referència de catálogo
Katalógusszám
Katalognummer
Numer katalogowy



Caution, consult accompanying documents
Achtung, Begleitdokumente beachten
Atención, ver instrucciones de uso
Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso
Attention voir notice d'instructions
Voorzichtig, raadpleeg bijgevoegde documenten
Försiktig se brugsanvisning
Huolellisuus
Upozornění viz příložená dokumentace
Pozor, prostuduj příloženou dokumentáciu
Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα
Atenção, consulte a documentação incluída
Figyelem! Olvassa el a mellékelt dokumentumokat
Försiktighet, se handhavandebeskrivningen
Uwaga, zapoznaj się z instrukcją stosowania



Batch code
Chargenbezeichnung
Código de lote
Codice del lotto
Code du lot
Lot nummer
Lotnummer
Číslo šarže
Číslo šarže
Αριθμός Παρτίδας
Código do lote
Sarzszzám
Lot nummer
Kod partii



Biological risks
Biogefährdung
Riesgo biológico
Rischio biologico
Risques biologiques
Biologisch risico
Biologisk fare
Biologicky nebezpečné
Biologicky rizikové
Βιολογικοί κίνδυνοι
Risco biológico
Biológiai kockázat
Biologisk risk
Ryzyko biologiczne
Ryzyko biologiczne



Temperature limitation
Temperaturbegrenzung
Limite de temperatura
Limiti di temperatura
Limites de température
Temperatuurlimiet
Temperaturbegrænsning
Teplotní rozmezí od do
Teplotné rozmedzie od do
Περιορισμοί θερμοκρασίας
Limites de temperatura
Hőmérsékletartomány
Temperaturbegrænsning
Przestrzeżać zakresu temperatury



Authorized Representative in the European Community
Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
Representante autorizado en la Comunidad Europea
Mandatario nella Comunità Europea
Mandataire dans la Communauté européenne
Gemachtigde in de Europese Unie
Repræsentant i det Europæiske Fællesskab
Zplnomocnený zástupce
Autorizované zastúpenie
Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα
Representante autorizado na Comunidade Europeia
Teljesjogú meghatalmazott az Európai Közösségben
Auktoriserad representant i Europeiska Gemenskapen
Autoryzowany Przedstawiciel w Unii Europejskiej