

1. Uso previsto

El test NADAL® Leptospira IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección simultánea y la diferenciación de IgG e IgM contra la *Leptospira interrogans* en el suero, el plasma o la sangre completa humanos. El test está indicado para usarse como test de screening y como una ayuda en el diagnóstico de la infección con *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*).

Los resultados obtenidos con el test NADAL® Leptospira IgG/IgM deben confirmarse con uno o más métodos de prueba alternativos.

2. Introducción y significado clínico

La leptospirosis ocurre en todo el mundo y es un problema de salud común de leve a grave para los humanos y animales, particularmente en áreas con un clima cálido y húmedo. Los reservorios naturales para la leptospirosis son los roedores y una gran variedad de mamíferos domesticados. La infección humana es causada por *L. interrogans*, un miembro patógeno del género *Leptospira*.^{1,2} La infección se transmite a través de la orina del animal huésped.

Después de la infección, la *leptospira* está presente en la sangre hasta que se elimina, aproximadamente entre 4 y 7 días después de la aparición de la enfermedad, luego de la producción de anticuerpos contra *L. interrogans*. Los anticuerpos contra la *leptospira* son detectables desde el sexto hasta el décimo día después de la infección. Sus niveles alcanzan su punto máximo a las 3 o 4 semanas y luego disminuyen gradualmente.³ Los anticuerpos se pueden detectar durante varios años después de la infección.³ La IgM contra la *leptospira* es detectable durante la primera semana de la enfermedad, lo que permite una intervención terapéutica temprana en el momento en que es más eficaz.³ La IgG contra la *leptospira* aparece en un momento posterior de la infección y puede durar durante varios años.

La detección serológica de los anticuerpos contra *L. interrogans* es un método de diagnóstico común. Los tests disponibles en esta categoría son: 1) la prueba de aglutinación microscópica (MAT);⁴ 2) ELISA;^{5,6} 3) la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT).⁶ El aislamiento de las leptospirosis mediante el cultivo de sangre, orina o líquido cefalorraquídeo es un método eficaz para confirmar el diagnóstico. No obstante, los métodos de cultivo solo se pueden aplicar en una etapa temprana de la infección –en la primera y segunda semana después de la exposición– y la leptospiremia se termina hacia el final de la primera semana de la enfermedad.³ Además, los métodos antes mencionados requieren una infraestructura sofisticada y técnicos bien capacitados.

El test NADAL® Leptospira IgG/IgM es un test serológico simple que utiliza antígenos de *L. interrogans* y detecta anticuerpos de IgG e IgM contra *L. interrogans* simultáneamente. El test puede ser realizado por personal no capacitado o mínimamente capacitado sin equipo de laboratorio complicado. El resultado está disponible en 15 minutos.

3. Principio del test

El test NADAL® Leptospira IgG/IgM es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral. El casete del test se compone

de: 1) una almohadilla conjugada de color burdeos que contiene antígenos de *L. interrogans* conjugados con oro coloidal (conjugados de *leptospira*) y anticuerpos de control conjugados con oro coloidal; 2) una tira de membrana de nitrocelulosa que contiene dos líneas de test ("M" y "G") y una línea de control ("C"). Los anticuerpos monoclonales contra la IgM humana para la detección de IgM contra *L. interrogans* están precubiertos en la línea del test "M"; los anticuerpos monoclonales contra la IgG humana para la detección de IgG contra *L. interrogans* IgG están precubiertos en la línea del test "G", y los anticuerpos de control están precubiertos en la línea "C".

Cuando se deposita un volumen adecuado de muestra y búfer en los pocillos ("S" y "B"), la muestra migra por acción capilar por todo el casete del test. Si es que en la muestra hay IgM contra *L. interrogans*, ésta se unirá a los conjugados de la *leptospira*. Los inmunocomplejos son entonces capturados en la membrana por los anticuerpos precubiertos contra la IgM humana, formando una línea "M" de color burdeos, lo que indica un resultado del test positivo a IgM contra *L. interrogans*. Si es que en la muestra hay IgG contra *L. interrogans*, ésta también se unirá a los conjugados de la *leptospira*. Los inmunocomplejos son entonces capturados en la membrana por los anticuerpos precubiertos contra la IgG humana, formando una línea "G" de color burdeos, lo que indica un resultado del test positivo a IgG contra *L. interrogans*. La ausencia de ambas líneas del test ("M" y "G") indica un resultado negativo.

El test contiene un control interno (línea de control "C") que siempre debe mostrar una línea burdeos del inmunocomplejo de anticuerpos de control independientemente del resultado de color de las líneas del test ("M" y "G"). De lo contrario, el resultado del test no es válido y la muestra debe volver a analizarse con otro casete del test.

4. Reactivos y materiales provistos

- 30 casetes de test NADAL® Leptospira IgG/IgM (incluye desecante)
- 30 tubos capilares desechables (5 µl)
- 1 búfer (botella de 5ml)
- 1 manual de instrucciones

5. Otros materiales necesarios

- Reloj o temporizador
- Dispositivo de punción para el análisis de la sangre completa.

6. Almacenamiento y conservación

Todos los reactivos están listos para usarse tal como se proporcionan. Guarde los casetes del test que no se han abierto a 2-30°C. Si los test se almacenan a 2-8°C, asegúrese de ponerlos a temperatura ambiente antes de abrirlos. El casete del test es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el envoltorio de aluminio sellado. Los kits del test no deben congelarse ni exponerse a temperaturas sobre los 30°C.

7. Advertencias y precauciones

- Solo para uso diagnóstico profesional *in-vitro*.
- Antes de realizar el test, lea detenidamente su procedimiento.

- No utilice el test después de la fecha de caducidad que se indica en el envase.
- No utilice el test si el envoltorio está dañado.
- No debe reutilizar los tests.
- No agregue muestras al área de reacción (área del resultado).
- Para evitar la contaminación, no toque el área de reacción (área del resultado).
- No sustituya ni mezcle componentes de diferentes kits del test.
- No utilice muestras hemolizadas para realizar el test.
- No debe comer, beber ni fumar en el área donde se manipulan las muestras o los kits del test.
- Cuando se analicen las muestras, use ropa protectora como batas de laboratorio, guantes desechables y protección ocular.
- Manipule todas las muestras como si contuvieran agentes infecciosos. Siga las precauciones indicadas contra los peligros microbiológicos durante todo el procedimiento y siga las guías estándares para la eliminación adecuada de las muestras.
- Los resultados del test deben leerse 15 minutos después de que se haya aplicado la muestra en el pocillo para la muestra del casete del test. Si los resultados se leen después de más de 15 minutos, éstos podrían ser erróneos.
- No realice el test en una habitación con flujo de aire fuerte, es decir, un ventilador eléctrico o un aire acondicionado fuerte.

8. Recolección y preparación de la muestra

Considere todo material de origen humano como infeccioso y manipúlelo utilizando procedimientos estándares de bioseguridad.

Plasma

- Tome una muestra de sangre en un tubo de recolección (que contenga EDTA, citrato o heparina) mediante venopunción.
- Separe el plasma por centrifugación.
- Extraiga cuidadosamente el plasma en un tubo nuevo previamente etiquetado.

Suero

- Tome una muestra de sangre en un tubo de recolección (que no contenga anticoagulantes) mediante venopunción.
- Deje que la sangre se coagule.
- Separe el suero por centrifugación.
- Extraiga cuidadosamente el suero en un tubo nuevo previamente etiquetado.

Analice las muestras lo antes posible luego de que las haya tomado. Almacene las muestras a 2-8°C durante un máximo de 5 días si es que no se analizarán inmediatamente. Las muestras deben congelarse a -20°C si se van a guardar por más tiempo.

Evite realizar múltiples ciclos de congelación y descongelación. Antes de realizar el test, ponga las muestras congeladas a temperatura ambiente lentamente y mezcle con cuidado. Las muestras que contengan partículas visibles deben clarificarse por centrifugación antes de realizar el test. No utilice muestras que presenten lipemia, hemólisis o turbidez con el fin de evitar interferencias con la interpretación de los resultados.

Sangre

Se pueden obtener gotas de sangre completa mediante la punción en la punta de un dedo o por venopunción. Tome una muestra de sangre en un tubo de recolección (que contenga EDTA, citrato o heparina). No utilice sangre hemolizada para realizar el test.

Las muestras deben analizarse dentro de 24 horas una vez que fueron tomadas. Las muestras de sangre entera se deben refrigerar (2-8°C) si es que no se analizan inmediatamente.

9. Procedimiento del test

Coloque la muestra y los componentes del test a temperatura ambiente. Mezcle bien la muestra antes de realizar el ensayo.

1. Cuando esté listo(a) para realizar el test, abra el envoltorio y saque el casete del test. Colóquelo sobre una superficie limpia y plana.
2. Etiquete el casete del test con un número de identificación de la muestra.
3. Llene un tubo capilar con una muestra, sin sobrepasar la línea de la muestra. El volumen de la muestra es aproximadamente de 5 µl.

Nota: Para una precisión óptima, transfiera la muestra utilizando una pipeta que pueda entregar un volumen de 5 µl.

4. Distribuya toda la muestra en el centro del pocillo para la muestra (S), asegurándose de que no hayan burbujas de aire.



O bien

5. Sosteniendo la botella en forma vertical, añada inmediatamente 2 gotas (aproximadamente 60-80 µl) de búfer al pocillo para el búfer (B). Asegúrese de que no hayan burbujas de aire.



6. Inicie el temporizador.

7. Lea los resultados del test después de 15 minutos. Los resultados positivos pueden visualizarse en tan solo 1 minuto. Los resultados negativos solo se confirman luego de 20 minutos. Los resultados no deben leerse después de más de 20 minutos. Para evitar confusiones, deseche el casete del test después de interpretar el resultado.

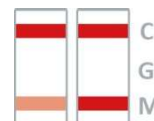


15-20 min

10. Interpretación del resultado

Positivo/reactivo para IgM:

Aparece una línea de color en la región de la línea de control (C) y aparece una línea de color en la región de la línea del test "M" para IgM. El resultado del test indica la presencia de IgM contra *L. interrogans*.



Positivo/reactivo para IgG:

Aparece una línea de color en la región de la línea de control (C) y aparece una línea de color en la región de la línea del test "G" para IgG. El resultado del test indica la presencia de IgG contra *L. interrogans*.

**Positivo/reactivo para IgG e IgM:**

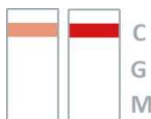
Además de la línea de control (C), aparecen dos líneas de color en la región de la línea del test: "G" para IgG y "M" para IgM. El resultado del test indica la presencia de IgM e IgG contra *L. interrogans*.



Las muestras con resultados positivos deben confirmarse con uno o más métodos de prueba alternativos y con los resultados clínicos antes de llegar a una determinación positiva.

Negativo:

Solo aparece la línea de control (C). La ausencia de las líneas del test "G" y "M" indica que en la muestra no se detectó IgG ni IgM contra *L. interrogans*.

**No válido:**

Si no aparece la línea de control (C), el ensayo no es válido independientemente de que aparezca color en las líneas del test "G" y "M". Repita el ensayo con un nuevo casete del test.



Se deben descartar los resultados de los test en los cuales no haya aparecido la línea de control dentro del tiempo de lectura indicado. Por favor, revise el procedimiento y repita el test con un nuevo casete del test. Si el problema persiste, deje de usar el kit del test inmediatamente y póngase en contacto con su distribuidor local.

Las razones más probables para que la línea de control falle son: volumen insuficiente de muestra, procedimiento incorrecto de operación o tests caducados.

11. Control de calidad**Control interno:**

La línea de color que aparece en la región de la línea de control (C) se considera un control interno de procedimiento. Ésta confirma un volumen de muestra suficiente, una adecuada absorción de la membrana y una técnica correcta de procedimiento.

Control externo:

Se recomienda usar los controles positivos y negativos externos para asegurar el correcto funcionamiento del ensayo.

12. Limitaciones

- Siga minuciosamente las secciones "Procedimiento del test" e "Interpretación del resultado" cuando se analiza la presencia de anticuerpos contra *L. interrogans* en el suero, el plasma o la sangre entera de cada uno de los sujetos. Si

es que no se sigue el procedimiento correcto, pueden obtenerse resultados inexactos.

- El test NADAL® Leptospira IgG/IgM está limitado a la detección cualitativa de anticuerpos contra *L. interrogans* en el suero, el plasma o la sangre entera humanos. La intensidad de la línea del test no tiene una correlación lineal con el título de anticuerpos en la muestra.
- El resultado negativo para cada sujeto indica la ausencia de anticuerpos contra *L. interrogans*. Sin embargo, el resultado negativo del test no excluye la posibilidad de exposición a *L. interrogans*.
- Puede producirse un resultado negativo si es que la cantidad de anticuerpos contra *L. interrogans* presente en la muestra es inferior al límite de detección del test o si es que los anticuerpos a detectar no se encontraban presentes aun en la etapa de la enfermedad en que se tomó la muestra.
- La infección puede avanzar rápidamente. Si los síntomas persisten y el resultado obtenido con el test NADAL® Leptospira IgG/IgM es negativo o no reactivo, se recomienda realizar el test con un método de prueba alternativo.
- Algunas muestras que contienen títulos inusualmente altos de anticuerpos heterófilos o factor reumatoide pueden afectar los resultados esperados.
- Dependiendo de los serovares circulantes de leptospira presentes regionalmente al momento de la toma de la muestra, la sensibilidad del test puede variar.
- Los resultados obtenidos con este test solo deben interpretarse en conjunto con otros procedimientos de diagnóstico y resultados clínicos.

13. Características del rendimiento**Exactitud**

Las muestras obtenidas de pacientes con sospecha de infección y personas normales se analizaron con el test NADAL® Leptospira IgG/IgM y con un test rápido de referencia disponible en el mercado. El test NADAL® Leptospira IgG/IgM presenta >99,9 % de especificidad y >99,9% de sensibilidad en comparación con el otro test rápido de referencia.

Reactividad cruzada

Las muestras de otras enfermedades infecciosas fueron analizadas por reactividad cruzada utilizando el test NADAL® Leptospira IgG/IgM según el procedimiento estándar. No se observó reactividad cruzada con las siguientes muestras (n=3-10):

VHA	VHB	VHC	VHE	<i>H. pylori</i>
hCG	VIH	Dengue	TB	<i>T. pallidum</i>
Tifoidea	ANA	HAMA	RF (hasta 8.400 UI/ml)	

Interferencia

Se estudió la interferencia de las siguientes sustancias comunes (como medicamentos para el dolor y la fiebre, componentes sanguíneos) con el rendimiento del test NADAL® Leptospira IgG/IgM mediante el aumento de los controles estándares negativos y positivos con estas sustancias.

La lista de sustancias potencialmente interferentes y concentraciones probadas es:

Albúmina	60 g/l
Hemoglobina	2 g/l
Bilirrubina	20 mg/dl
Heparina	3.000 U/l
Creatinina	442 µmol/l
IgG Humana	1000 mg/dl
EDTA	3,4 µmol/l
Ácido salicílico	4,34 mmol/l
Glucosa	55 mmol/l
Citrato de sodio	3,8 %

Los resultados demuestran que, en las concentraciones analizadas, las sustancias estudiadas no afectan el rendimiento del test NADAL® Leptospira IgG/IgM.

14. Referencias

1. Stallman GND. The International Committee on Systematic Bacteriology: Sub committee on the Taxonomy of Leptospira. *Int J Syst Bacteriol* 1987; 37:472.
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-326
3. Ahmad SN, Shah S, Ahmad FMH. Laboratory diagnosis of Leptospirosis. *J Postgrad Med* 2005;51:195-200.
4. Faine S, ed. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982.
5. Cumberland PC, Everard COR, Levett PN. Assessment of the efficacy of the IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:731-734.
6. Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1980;11:452-457.
7. Appasakij H, Silpapojakul K, Wansit R, et al: Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52:340.

Rev. 0, 2016-10-17 CG/MP