

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## Leptospira vet ELISA

RUO

REF

DELEPVT0660



96



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**CONTENTS**

1. INTRODUCTION	3
2. INTENDED USE	3
3. PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
4. MATERIALS	4
5. STABILITY AND STORAGE	4
6. REAGENT PREPARATION	4
7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION	5
8. ASSAY PROCEDURE	5
9. RESULTS	6
10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	7
12. PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
BIBLIOGRAPHY	9
ABBREVIATIONS	9
SUMMARY OF THE PROCEDURE	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. USO PREVISTO	11
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO	11
4. MATERIALES	12
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE	12
6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	12
7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	13
8. PROCEDIMIENTO	13
9. CALCULO DE LOS RESULTADOS	14
10. CARACTERISTICAS DEL ENSAYO	14
11. LIMITACIONES DEL ENSAYO	15
12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	15
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

## 1. INTRODUCTION

Leptospirosis is probably the most widespread zoonosis in the world. It is caused by infection with spirochete bacteria of the genus *Leptospira* and affects humans as well as a broad spectrum of animal hosts (e.g. dogs, pigs, cattle). The incidence is significantly higher in warm climate countries than in temperate regions. The disease is seasonal, with peak incidence occurring in summer or fall in temperate regions, where temperature is the limiting factor in survival of leptospires, and during rainy seasons in warm climate regions, where rapid desiccation would otherwise prevent survival. Natural reservoirs for the pathogenic *Leptospira interrogans* include rodents as well as a large variety of domesticated mammals. Leptospires occupy the lumen of nephritic tubules in their natural host and are shed into the urine. Transmission can occur when humans or animals are directly or indirectly exposed to the urine of infected animals or a urine-polluted environment. Leptospires gain entry into the blood stream via cuts, skin abrasions or mucous membranes through contact with moist soil, vegetation, contaminated water and also by handling infected animal tissues or ingestion of food and water. The incubation period is usually 5-14 days, with a range of 2-30 days. The spectrum of clinical symptoms is extremely wide. The vast majority of leptospiral infections are either subclinical or result in very mild illness and recover without any complications. Clinical manifestations of leptospirosis range from mild influenza-like symptoms to severe life-threatening disease forms, characterized by jaundice, renal failure, bleeding and severe pulmonary hemorrhage. Acute kidney injury (AKI) is the most commonly recognized disease in dogs, accounting for more than 90 % of reported cases of leptospirosis. Hepatic disease occurs concurrently in 10-20 % of dogs with AKI. *Leptospira pomona* and *Leptospira hardjo* cause a febrile syndrome, loss of appetite, and, in dairy cows, a large drop in - even the suppression of - milk secretion for a period ranging from two to ten days. *L. pomona* causes important reproductive problems in female breeding pigs spreading slowly through the herd. *L. tarassovi* causes a similar syndrome as *L. pomona* but tends to be milder and to spread more slowly. The clinical presentation of leptospirosis is biphasic, with the acute or septicemic phase lasting about a week, followed by the immune phase, characterized by antibody production and excretion of leptospires in the urine. Most of the complications of leptospirosis are associated with localization of leptospires within the tissues during the immune phase.

The presence of pathogen resp. infection may be identified by

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

## 2. INTENDED USE

The Leptospira vet ELISA is intended for the qualitative determination of antibodies against *Leptospira* in veterinary serum.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique. Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

1. **SORB** **MT** **Microtiterplate**: 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Leptospira antigens; in resealable aluminium foil.
2. **SAM** **DIL** **Sample Dilution Buffer**: 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH  $7.2 \pm 0.2$ ; coloured yellow; ready to use; white cap;  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1).
3. **STOP** **SOLN** **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
4. **WASH** **SOLN** **20x** **Washing Buffer (20x conc.)**: 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH  $7.2 \pm 0.2$ , for washing the wells; white cap.
5. **ENZ** **CONJ** **Conjugate**: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled Protein A/G; coloured yellow; ready to use; white cap;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
6. **SUB** **TMB** **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB),  $< 0.1\%$ ; ready to use; yellow cap.
7. **CAL** **C** **Positive Control**: 1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; red cap;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
8. **CAL** **B** **Cut-off Control**: 1 vial containing 3 mL; coloured yellow; ready to use; green cap;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
9. **CAL** **A** **Negative Control**: 1 vial containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; blue cap;  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

### 4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)

### 4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplate wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000  $\mu$ L
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

## 5. STABILITY AND STORAGE

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

## 6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run

### 6.1. Microtiterplate

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

### 6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

### 6.3. TMB Substrate Solution

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

## 7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

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

### 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

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

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

Adjust the incubator to  $37 \pm 1$  °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour  $\pm$  5 min at  $37 \pm 1$  °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

### 8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

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

**Measure the absorbance** of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the-plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

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

## 9. RESULTS

### 9.1. Run Validation Criteria

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

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

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

### 9.2. Calculation of Results

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

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

Cut-off = 0.43

#### 9.2.1. Results in Units [U]

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

Example:  $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ U}$

### 9.3. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own sample populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

Cut-off	10 U	-
Positive	> 11 U	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 U	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as <b>negative</b> .
Negative	< 9 U	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.

**10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. The performance data have been established with canine samples. Due to the nature of the Protein A/G conjugate this ELISA should react with other mammalian species also. More detailed information is available on request.

**10.1. Precision**

<b>Intraassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (E)</b>	<b>CV</b>
<b>(%)</b>			
#1	24	0.176	11.78
#2	24	1.237	7.50
#3	24	0.324	8.47

<b>Interassay</b>	<b>n</b>	<b>Mean (U)</b>	<b>CV (%)</b>
#1	12	3.63	3.68
#2	12	10.89	4.93
#3	12	30.98	3.85

**10.2. Specificity**

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

Specificity canine: 100.0 % (95 % confidence interval: 59.04 % - 100.0 %)

**10.3. Sensitivity**

The sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

Sensitivity canine: 88.89 % (95 % confidence interval: 51.75 % - 99.72 %)

**10.4. Interferences**

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

**10.5. Cross Reactivity**

Cross reactions cannot be excluded.

**11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

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

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- Only for research use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

### 12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

#### Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray
P280	Wear protective gloves/protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

### 12.2. Disposal Considerations

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



**BIBLIOGRAPHY**

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

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

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

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

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

Johnson, R. C. (2001) *Leptospira*. In: *Medical Microbiology*. edited by Baron, S. The University of Texas Medical Branch  
Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr;14(2):296-326.

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

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

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

Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008 Nov;33(4):557-69.  
World Health Organization. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. WHO (2003)

Major A, Schweighauser A, Francey T. Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int J Environ Res Public Health.* 2014 Jul 16;11(7):7242-60. doi: 10.3390/ijerph110707242.

Alton GD, Berke O, Reid-Smith R, et al. Increase in seroprevalence of canine leptospirosis and its risk factors, Ontario 1998–2006. *Can J Vet Res.* 2009;73:167–175.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2011;25:1–13.

**ABBREVIATIONS**

<b>CMIT</b>	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
<b>MIT</b>	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

**SUMMARY OF THE PROCEDURE****SCHEME OF THE ASSAY**

Leptospira vet ELISA

**Test Preparation**

Prepare reagents and samples as described.  
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.  
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

**Assay Procedure**

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37±1 °C</b> Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C)</b> Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark</b>					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

## 1. INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es probablemente la zoonosis más extendida en el mundo. Es causada por una infección con bacterias espiroquetas del género *Leptospira* y afecta a los seres humanos, así como a un amplio espectro de huéspedes animales (por ejemplo, perros, cerdos, ganado vacuno). La incidencia es significativamente mayor en los países de clima cálido que en las regiones templadas. La enfermedad es estacional, con una incidencia máxima se produce en verano u otoño en las regiones templadas, donde la temperatura es el factor limitante en la supervivencia de las *leptospiras* y en épocas de lluvia en las regiones de clima cálido al contrario donde hay rápida desecación puede prevenir la supervivencia. Los reservorios naturales de los patógenos *Leptospira interrogans* incluyen roedores, así como una gran variedad de mamíferos domésticos. Las *Leptospiras* ocupan el lumen de los túbulos nefríticos en su huésped natural y se arrojan por la orina.

La transmisión puede ocurrir cuando los seres humanos o los animales están expuestos directa o indirectamente a la orina de animales infectados o un ambiente contaminado con orina. Las leptospiras pueden entrar al torrente sanguíneo a través de cortes, abrasiones de la piel o las membranas mucosas, a través del contacto con el suelo húmedo, vegetación, agua contaminada y también por el manejo de tejidos de animales infectados o ingestión de alimentos y agua contaminada. El período de incubación es generalmente de 5-14 días, con un rango de 2-30 días. El espectro de síntomas clínicos es muy amplio. La gran mayoría de las infecciones por leptospiras son subclínicas o el resultado de una enfermedad muy leve se recupera sin complicaciones. Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis van desde síntomas leves similares a la gripe a las formas de enfermedad grave, potencialmente mortal, que se caracteriza por ictericia, insuficiencia renal, hemorragias y hemorragia pulmonar grave. La lesión renal aguda (IRA) es la enfermedad más comúnmente reconocida en los perros, lo que representa más del 90 % de los casos de leptospirosis. La Enfermedad hepática ocurre al mismo tiempo y se da en el 10-20 % de los perros con IRA. *Leptospira pomona* y *Leptospira hardjo* causan un síndrome febril, pérdida de apetito y en las vacas lecheras una gran caída en la secreción de leche e incluso la supresión por un período de dos a diez días. *L. pomona* causa problemas reproductivos importantes en cerdos reproductores femeninos y se extienden lentamente a través de la manada. *L. tarassovi* causa un síndrome similar a *L. pomona* pero tiende a ser más suave y difundirse más lentamente. La presentación clínica de la leptospirosis es bifásica, con la fase aguda o septicémica dura alrededor de una semana, seguido de la fase inmune, caracterizada por la producción de anticuerpos y excreción de leptospiras en la orina.

La mayoría de las complicaciones de la leptospirosis se asocian con la localización de las leptospiras dentro de los tejidos durante la fase inmune.

La presencia de patógenos responsables de la infección puede ser identificado por

- Detección del patógeno: microscopía de campo oscuro de un cultivo de sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o tejido PCR
- Serología: prueba de aglutinación microscópica (MAT), ELISA

## 2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo de *Leptospira* ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos contra *Leptospira* en suero de veterinario.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimático cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unido, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualizó añadiendo substrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

## 4. MATERIALES

### 4.1. Reactivos suministrados

- 1) **SORB MT Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Leptospira, en bolsa de aluminio.
- 2) **SAM DIL Tampón de Dilución de Muestras:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca;  $\leq 0,0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- 3) **STOP SOLN Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- 4) **WASH SOLN 20x Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; tapa blanca.
- 5) **ENZ CONJ Conjugado:** 1 botella de 20 mL Proteína A/G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP); color amarillo; tapa blanca; listo para ser utilizado;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
- 6) **SUB TMB Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB),  $< 0,1\%$ ; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- 7) **CAL C Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado;  $\leq 0,02\%$  (v/v) MIT.
- 8) **CAL B Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado;  $\leq 0.02\%$  (v/v) MIT.
- 9) **CAL A Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado;  $\leq 0.0015\%$  (v/v) CMIT/MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

### 4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000  $\mu$ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

## 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

## 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

### 6.1. Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígenos del Leptospira; Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

### 6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL de la Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. La Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2...8 °C. Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

### 6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizada en el ensayo.

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero canino con este ensayo. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavado de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso. Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso. Graduar la incubadora a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h  $\pm$  5 min a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL de la Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.  
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de Conjugado en cada pocillo con excepción del blanco sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100 µL de la Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

### 8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de esta debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en la **esquema de la placa**. Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm. Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control negativo:** valor de la extinción < **0,200 y < Cut-off**
- **Control cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

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

### 9.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de lo Control cut-off.

Ejemplo:  $0,42 \text{ OD Control cut-off} + 0,44 \text{ OD Control cut-off} = 0,86:2 = 0,43$   
Cut-off = 0,43

#### 9.2.1. Resultados en unidades [U]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unidades} = \text{U}]$

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

### 9.3. Interpretación de los resultados

Los intervalos de valores normales para el ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio con base en las muestras de la propia población en las áreas geográficas atendidas.

Estos son los datos normativos:

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como <b>negativa</b> .
Negativo	< 9 U	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.

## 10. CARACTERISTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en lo grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas. Los datos de rendimiento se han determinado con muestras de suero caninos. Debido a las propiedades del conjugado proteína A/G, el ELISA debe reaccionar con las muestras de todos mamíferos.

Información más detallada está disponible bajo petición.

### 10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,176	11,78
#2	24	1,237	7,50
#3	24	0,324	8,47

Inter ensayo	n	Promedio (U)	CV (%)
#1	12	3,63	3,68
#2	12	10,89	4,93
#3	12	30,98	3,85

### 10.2. Especificidad

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico.

Especificidad canino: 100,0 % (95 % Intervalo de confianza: 59,04 % - 100,0 %)

**10.3. Sensibilidad**

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

Sensibilidad canino: 88,89 % (95 % Intervalo de confianza: 51,75 % - 99,72 %)

**10.4. Interferencias**

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

**10.5. Reacción cruzada**

Las reacciones cruzadas no pueden ser excluidas.

**11. LIMITACIONES DEL ENSAYO**

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

**12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS**

- Sólo para uso de investigación.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

**12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas**

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

**Atención**














H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

**12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos**

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

**SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS**

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta