

LEPTOSPIRA CARD

Apenas para diagnóstico *in vitro*

Teste Imunocromatográfico em cassete para detecção qualitativa de anticorpos IgG/IgM contra *Leptospira* em soro, plasma e sangue total humano

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O **Leptospira Card** Card é um imunoenensaio de fluxo lateral para a detecção e diferenciação simultâneas de anticorpos IgG e IgM contra *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) no soro, plasma ou sangue total humano. Destina-se a ser utilizado como teste de rastreio e como auxiliar no diagnóstico de infecção por *L. interrogans*. Qualquer amostra reativa com o teste Leptospira Card deve ser confirmada com testes alternativos.

II. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A leptospirose ocorre em todo o mundo e é um problema de saúde moderado a grave comum para humanos e animais, principalmente em áreas com clima quente e húmido. Os reservatórios naturais da leptospirose são roedores, assim como uma grande variedade de mamíferos domesticados. A infecção humana é causada por *L. interrogans*, o membro patogénico do género *Leptospira*^{1,2}. A infecção é transmitida através da urina do animal hospedeiro.

Após a infecção, as leptospirosas estão presentes no sangue até serem eliminadas depois de 4 a 7 dias após a produção de anticorpos anti-*L. interrogans*, inicialmente da classe IgM. A cultura do sangue, urina e líquido cefalorraquidiano é um meio eficaz de confirmar o diagnóstico entre a primeira e a segunda semanas após a exposição. A detecção serológica de anticorpos anti-*L. interrogans* também é um método de diagnóstico comum. Os testes estão disponíveis consoante a categoria: 1) Teste de aglutinação microscópica (MAT)³; 2) ELISA⁴⁻⁵; 3) Testes indiretos de anticorpos fluorescentes (IFATs)⁶. No entanto, todos os métodos acima mencionados exigem instalações sofisticadas e técnicos bem treinados.

O Leptospira Card é um teste serológico simples que utiliza antígenos de *L. interrogans* e deteta anticorpos IgG e IgM contra esses microrganismos simultaneamente. O teste pode ser realizado por pessoal não treinado ou minimamente qualificado, sem equipamento de laboratório pesado e o resultado está disponível em 15 minutos.

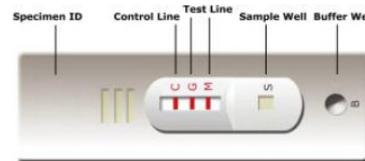
III. PRINCÍPIO DO TESTE

O Leptospira Card é um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral. A cassete de teste consiste em: 1) um poço conjugado de cor bordô contendo antígenos recombinantes de *L. interrogans* conjugados com ouro coloidal (conjugados de Leptospira) e IgG de coelho conjugados com ouro, 2) uma tira de membrana de nitrocelulose contendo duas bandas de teste (bandas M e G) e uma banda de controlo (banda C). A banda M é pré-revestida com IgM monoclonal anti-humano para a detecção de IgM anti-*L. interrogans*, a banda G está pré-revestida com reagentes para a detecção de IgG anti-*L. interrogans*, e a banda C é pré-revestida com IgG de cabra anti-coelho.

Quando um volume adequado de amostra é dispensado no poço de amostra da cassete, a amostra migra por ação da capilaridade através da cassete. Se estiverem presentes na amostra IgM Anti-*L. interrogans* vão-se ligar à Leptospira conjugada. O imunocomplexo é então capturado na membrana pelo anticorpo IgM anti-humano pré-revestido, formando uma banda M de cor bordô, indicando um resultado de teste positivo para IgM contra *L. interrogans*.

Se estiverem presentes na amostra IgG anti-*L. interrogans* vão-se ligar à Leptospira conjugada. O imunocomplexo é então capturado pelos reagentes pré-revestidos na membrana, formando uma banda G de cor bordô, indicando um resultado de teste positivo para IgG contra *L. interrogans*.

A ausência de uma banda T (M e G) sugere um resultado negativo. O teste contém um controlo interno (banda C) que deve aparecer uma banda de cor bordô do imunocomplexo IgG de cabra anti-coelho / IgG de coelho conjugado com ouro, independentemente do desenvolvimento da cor em qualquer uma das bandas T. Caso contrário, o resultado do teste é inválido e a amostra deve ser testada novamente com outra cassete.



IV. REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

- Cada kit contém 10 cassetes de teste, cada uma dentro de um invólucro selado de alumínio com os seguintes itens lá dentro:
 - 1 cassete
 - 1 excicante
- Diluente da amostra (1 frasco 1,5 mL)
- Tubos capilares de 5 µL (10 itens)
- Instruções de utilização.

V. MATERIALIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Relógio ou cronómetro
- Lancetas para o teste com sangue total



VI. PRECAUÇÕES

1. O Kit é para ser utilizado por profissionais e apenas para diagnóstico *in vitro*.
2. Ler atentamente o folheto de instruções antes de usar este teste. Não seguir as suas instruções de utilização pode levar a resultados de teste inadequados.
3. Não abrir o invólucro selado antes de estar tudo pronto para realizar o ensaio.
4. Não usar cassetes fora do prazo de validade.
5. Deixar que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (15° C-30° C) antes de usar.
6. Não usar os componentes de qualquer outro tipo de kit como substituto dos componentes deste kit.
7. Não usar amostras de sangue hemolisado para teste.
8. Usar bata e luvas descartáveis ao manipular os reagentes do kit e as amostras clínicas. Lave bem as mãos depois de realizar o teste.
9. Não comer, beber ou fumar na área onde as amostras e os reagentes do kit são manuseados.
10. Descartar todas as amostras e materiais usados para realizar o teste como resíduos de risco biológico.
11. Os resultados do teste devem ser lidos até 15 minutos após a amostra ser aplicada no poço da amostra. Ler o resultado depois dos 15 minutos pode dar resultados errados.
12. Não realizar o teste numa sala com fluxo de ar forte, ou seja, um ventilador elétrico ou ar condicionado forte.

VII. INSTRUÇÕES PARA PREPARAÇÃO DO REAGENTE E CONSERVAÇÃO

Todos os reagentes são fornecidos prontos-a-usar. Armazenar as saquetas de teste que não estão em uso fechadas entre 2° C e 30° C. Se estiver armazenado a 2° C-8° C, certificar de que a cassete de teste atinge a temperatura ambiente antes de abrir. A cassete de teste é estável até à data de validade impressa no invólucro selado. Não congelar nem expor o kit a mais de 30° C.

VIII. COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Considerar quaisquer materiais de origem humana como infecciosos e manusear usando procedimentos adequados de biossegurança.

Plasma

1. Colher a amostra de sangue num tubo de colheita de tampa azul ou verde (contendo EDTA, citrato ou heparina, respetivamente, em Vacutainer®) por venopunção.
2. Separar o plasma por centrifugação.
3. Retire cuidadosamente o plasma para um novo tubo pré-rotulado.

Soro

1. Colher as amostras de sangue num tubo de colheita de tampa vermelha (sem anticoagulantes no Vacutainer®) por venopunção.
2. Deixe o sangue coagular.
3. Separar o soro por centrifugação.
4. Retirar cuidadosamente o soro para um novo tubo pré-rotulado.

Teste as amostras o mais rápido possível após a colheita. Armazenar as amostras a 2° C - 8° C se não for testado imediatamente, até 5 dias. As amostras devem ser congelados a -20° C para períodos mais longos. Evite vários ciclos de congelação e descongelação. Antes de testar, deixe as amostras congeladas atingir a temperatura ambiente lentamente e misture suavemente. Amostras contendo partículas visíveis devem ser centrifugadas antes de serem testadas. Não usar amostras que demonstrem bastante lipémia, hemólise grosseira ou turbidez, para evitar interferência na interpretação dos resultados.

Sangue total

Gotas de sangue total podem ser obtidas quer pela punção na ponta do dedo quer pela punção venosa. Não usar sangue hemolisado para teste.

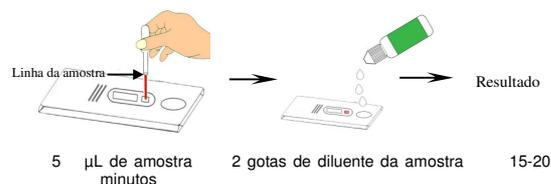
As amostras de sangue total devem ser armazenadas refrigeradas (2° C a 8° C) se não forem testadas imediatamente. As amostras devem ser testados dentro de 24 horas após a colheita.

IX. PROCEDIMENTO

1. Deixar a amostra e componentes do teste atingir a temperatura ambiente, se estiverem refrigerados ou congelados. Uma vez descongelada, misturar bem a amostra antes da execução do teste.
2. Quando estiver tudo preparado para executar o teste, abrir o invólucro e retirar a cassete. Colocar a cassete de teste numa superfície plana e limpa.
3. Colocar a identificação da amostra ou número de controlo na cassete de teste.
4. Encher o capilar com a amostra, mas não exceder a linha de amostra, como mostra na imagem a seguir (cerca de 5 µL). Segurando o conta-gotas na vertical, distribua toda a amostra no centro do poço da amostra (S), certificando-se de que não há bolhas de ar.

Nota: Pratique algumas vezes antes da execução do teste, se não estiver familiarizado com o mini conta-gotas.

Para melhor precisão, transfira a amostra com pipeta capaz de fornecer 5 µL de volume.



5. Adicione 2 gotas (60-80 µl) de diluente da amostra imediatamente no poço do tampão (B).



6. Leia o resultado do teste passado 15 a 20 min. Quaisquer resultados interpretados fora da janela de 15-20 minutos devem ser considerados inválidos e devem ser repetidos. Descartar as cassetes usadas após a interpretação do resultado, seguindo os requisitos locais que regem a eliminação dos dispositivos.

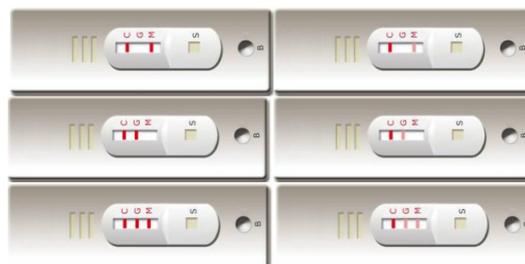
X. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1. **RESULTADO NEGATIVO** Se apenas a banda C está presente, a ausência da cor bordô nas duas bandas T (M e G) indica que nenhum anticorpo IgM e IgG anti-*L. interrogans* é detectado na amostra. O resultado é negativo.

- 2.1 **RESULTADO POSITIVO:** Para além da presença da banda C, se surgir corada apenas a banda M, o teste indica a presença de IgM anti-*L. interrogans* na amostra. O resultado é positivo.

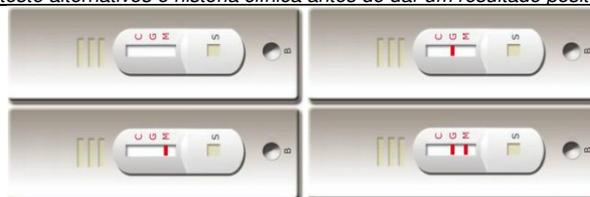
Para além da presença da banda C, se surgir corada apenas a banda G, o teste indica a presença de IgG anti-*L. interrogans* na amostra. O resultado é positivo.

Para além da presença da banda C, se surgirem coradas ambas as bandas M e G, o teste indica a presença de IgM e IgG anti-*L. interrogans* na amostra. O resultado é positivo.



As amostras com resultados positivos devem ser confirmadas com métodos de teste alternativos e história clínica antes de dar um resultado positivo.

3. **INVÁLIDO:** Se a banda C não surgir corada, o teste é considerado inválido, independentemente de qualquer cor bordô que surja nas bandas M e G, como mostra nas imagens. Repetir o teste com uma nova cassete.



XI. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Precisão

Foram estudadas amostras colhidas de pacientes suspeitos e indivíduos normais. O Leptospira Card mostra 100% de especificidade (95% CI: 47.8-100%) e 100% de sensibilidade (95% CI: 78.2-100%) em comparação com um teste rápido de referência do mercado.

Reações-cruzadas

Amostras de outras doenças infecciosas foram testadas quanto a reações-cruzadas com o Leptospira Card de acordo com o procedimento normal. Os resultados mostraram que as seguintes amostras (n=3-10) não reagiram com o Leptospira Card.

| | | | | |
|---------|-----|--------|------------------------|--------------------|
| HAV | HBV | HCV | HEV | <i>H. pylori</i> |
| hCG | HIV | Dengue | TB | <i>T. pallidum</i> |
| Typhoid | ANA | HAMA | RF (up to 8,400 IU/mL) | |

Interferentes

Substâncias comuns (como medicamentos para dor e febre, componentes do sangue) podem afetar o desempenho do Leptospira Card. Isto foi estudado colocando essas substâncias em controlos padrão negativos e positivos. Os resultados são apresentados na tabela a seguir e demonstram, nas concentrações testadas, que as substâncias estudadas não afetam o desempenho do Leptospira Card.

| | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1. Albumin 60 g/L | 5. Glucose 55 mmol/L | 9. Salicylic acid 4.34 mmol/L |
| 2. Bilirubin 20 mg/dL | 6. Hemoglobin 2 g/L | 10. Sodium Citrate 3.8% |
| 3. Creatinine 442 µmol/L | 7. Heparin 3,000 U/L | |
| 4. EDTA 3.4 µmol/L | 8. Human IgG 1000 mg/dL | |

XII. LIMITAÇÕES DO TESTE

- O procedimento e a interpretação dos resultados do teste devem ser rigorosamente seguidos para testar a presença de anticorpos contra o *L. interrogans* em soro, plasma ou sangue total de indivíduos. O não cumprimento do procedimento pode levar a resultados incorretos.
- O Leptospira Card está limitado à detecção qualitativa de anticorpos contra *L. interrogans* em soro, plasma ou sangue total. A intensidade da banda de teste não tem correlação linear com o título de anticorpos na amostra.
- Um resultado negativo para um indivíduo indica a ausência de anticorpos detectáveis anti-*L. interrogans*. No entanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de exposição a *L. interrogans*.
- Um resultado negativo pode ocorrer se a quantidade de anticorpos de *L. interrogans* presente na amostra for inferior aos limites de detecção do teste, ou os anticorpos que são detetados não estão presentes durante a fase da doença quando a amostra foi colhida.
- Algumas amostras contendo título involuntariamente elevado de anticorpos heterófilos ou fator reumatóide podem afetar os resultados esperados.
- Os resultados obtidos com este teste devem ser interpretados em conjunto com outros meios de diagnóstico e história clínica.



XIII. REFERÊNCIAS

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. Faine S, ed. Guidelines for the control of leptospirosis. Geneva: World Health Organization, 1982.
4. 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.
5. 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.
6. Appassakij 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

| | | | | | | | |
|---|--|---|-------------------------------|---|--------------------|---|------------------------------|
|  IVD | Dispositivo para Diagnóstico <i>in vitro</i> |  | Limites de temperatura de |  LOT | Código de lote de |  | Fabricante |
|  i | Consultar as instruções de utilização |  | Data do prazo de validade |  REF | Número de catálogo |  | Não reutilizar |
|  | Conservar seco |  | Frágil, manipular com cuidado |  NON STERILE | Não estéril |  | Manter afastado da luz solar |

CONTEÚDO (10 testes)

Leptospira Card
Diluyente da Amostra
Capilares de 5 µL
Instruções de utilização

COD. VQ85100

10 Cassetes
1 x 1,5 mL
10 itens
1 item

EDMA Code 15 05 10 90 00

