



INgezim® LEISHMANIA 2.0

Prod. Ref: 15.LS2.K1

Ensayo inmunoenzimático de tipo indirecto para la detección de anticuerpos específicos frente a Leishmania, en suero y sangre de perro.

Indirect enzymatic immunoassay for the detection of Leishmania-specific antibodies in dog serum and blood.

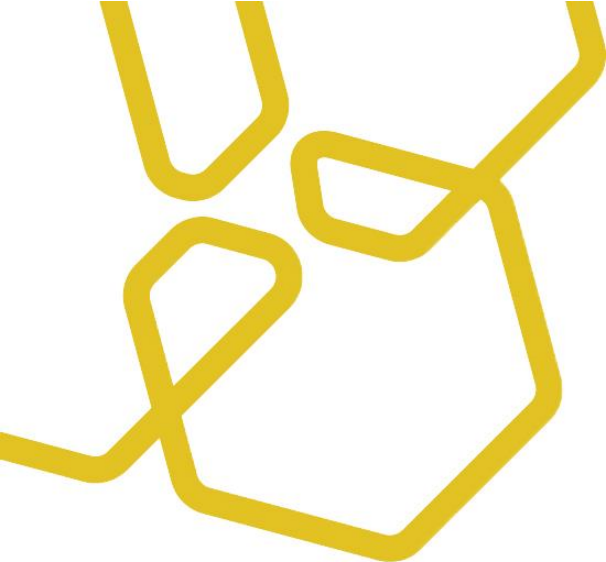
Version Doc:25-08-2025

Nº de registro en España: 12634-RD-RD

Registration number in Spain: 12634-RD



**GOLD
STANDARD
DIAGNOSTICS**



**GOLD
STANDARD
DIAGNOSTICS**

COMPOSICIÓN DEL KIT

REACTIVO	1 Placas		10 Placas	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Placas de microtitulación	1		10	
Viales conteniendo Suero Control Negativo, listo para usar	1	3,5 mL	1	10 mL
Viales conteniendo Suero Control Positivo, listo para usar	1	3,5 mL	1	10 mL
Viales de Conjugado Peroxidasa concentrado	1	1,5 mL	1	13 mL
Frascos conteniendo Solución de Lavado concentrada 10x	1	100 mL	8	250 mL
Frascos conteniendo Diluyente (DE03-01), listo para usar	1	125 mL	5	250 mL
Frascos conteniendo Sustrato (TMB), listo para usar	1	15 mL	3	60 mL
Frascos conteniendo Solución de Frenado, listo para usar	1	15 mL	2	125 mL

OTROS MATERIALES Y REACTIVOS NO INCORPORADOS EN EL KIT

Agua destilada o desionizada.
Micropipetas de 5 a 200 µL.
Puntas de micropipeta de un solo uso.
Dispositivos para lavado de placas.
Probetas de 50-250 mL.
Lector ELISA (filtro de 405 nm)

FUNDAMENTO TÉCNICO DEL KIT

Nuestro kit se basa en un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA Indirecto). A continuación, se describe brevemente la técnica: Sobre un soporte sólido (placa de poliestireno), se fija el antígeno recombinante capaz de unirse a anticuerpos específicos de Leishmania. Cuando sobre la placa se dispensa la muestra problema, en el caso de que existan anticuerpos específicos frente a este antígeno, éstos quedarán fijados a la misma. Tras realizar una serie de lavados con los que se eliminará el resto de los componentes del suero no adheridos, podremos revelar la presencia de inmunoglobulinas de perro mediante un conjugado específico marcado con peroxidasa. Tras añadir un sustrato apropiado, se producirá una reacción colorimétrica azul que podrá ser leída mediante un espectrofotómetro a 450nm. En nuestro kit es de resaltar la utilización de antígeno recombinante. Esto garantiza la total ausencia de infectividad en cualquiera de los componentes del kit.

El ensayo, debido al uso de un antígeno que no está presente en ninguna de las vacunas actualmente en el mercado, puede considerarse un ensayo DIVA capaz de diferenciar entre animales vacunados e infectados. En la situación actual no existe riesgo de vacunas que pudieran interferir en el resultado. Sin embargo, esta situación podría cambiar en un futuro, por lo que se recomienda tener en cuenta este posible escenario.

PRECAUCIONES

- Leer atentamente las instrucciones de uso.
- Mantener los reactivos a temperatura ambiente al menos 2 horas antes de su utilización. ¡MUY IMPORTANTE!
- No mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
- Evitar cualquier contaminación de los reactivos.
- No utilizar los kits una vez superada la fecha de caducidad.
- No comer, beber ni fumar mientras se manipulen los reactivos y/o las muestras.
- No pipetear los reactivos con la boca.
- Utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.
- Incluir sistemáticamente un control positivo y un control negativo siempre que se utilice el kit.
- La solución de frenado es un ácido fuerte, por lo que debe ser manipulada con precaución. En caso de contacto con piel y ojos, lavar inmediatamente con agua abundante.
- El sustrato es muy sensible tanto a la luz como a las contaminaciones. Retirar del frasco la cantidad necesaria por decantación o con pipeta estéril y nunca devolver al frasco el sustrato sobrante.

NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Mantener todos los componentes entre +2°C y +8°C, para mantenerlos estables hasta la fecha de caducidad indicada.

INFORMACIÓN SOBRE EL MODO DE REALIZAR LOS LAVADOS

Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µL por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

- Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución, el vaciado de los pocillos debe realizarse sobre una cubeta que contenga una solución de sosa, ya que, si bien el antígeno utilizado en el kit es absolutamente inerte, los sueros problema pueden contener agentes infecciosos.
- Distribuir unos 300 µL de solución de lavado por pocillo.
- Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Repetir el proceso cuantas veces sea indicado.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente, para eliminar cualquier resto de solución de lavado.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Realizar la dilución 1/100 en el diluyente DE03-01 suministrado (Por ejemplo 5 µL de suero + 495 µL de diluyente de suero, DE03-01). Para titular, recomendamos diluciones factor2 seriadas desde la 1/100.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Solución de lavado: Diluir una parte de solución concentrada en 9 partes de agua destilada (100 mL de solución concentrada más 900 mL de agua destilada). Una vez preparada la solución permanece estable mantenida entre +2°C y +8°C.
- Sueros Controles (+) y (-): Los sueros controles se presentan listos para su uso. No diluir.
- Diluyente: se presenta listo para su uso. No diluir.
- Conjugado: El conjugado se presenta concentrado. Diluir en el diluyente suministrado en función del procedimiento a seguir. Homogeneizar bien la solución antes de su uso. Preparar sólo el volumen necesario a utilizar, ya que la solución sobrante ha de ser desechada.
 - o Procedimiento manual: Diluir 1/10:
 - La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 1100 µL de conjugado en 9,900 mL de diluyente.
 - La cantidad necesaria y suficiente para una tira de 8 pocillos es: 100 µL de conjugado en 0,9 mL de diluyente.
 - o Procedimiento automático: Diluir 1/70:
 - La cantidad necesaria y suficiente para una placa es: 158 µL de conjugado en 10,842 mL de diluyente.
 - La cantidad necesaria y suficiente para una tira de 8 pocillos es: 15 µL de conjugado en 0,985 mL de diluyente.

PROCEDIMIENTO

PROCEDIMIENTO MANUAL

- Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (al menos 2 horas).
- Dispensar 100 µL de suero control positivo y 100 µL de suero control negativo (listos para su uso) en dos pocillos (se recomienda hacer por duplicado).
- Dispensar 100 µL de muestra DILUIDA en los pocillos correspondientes. Se recomienda hacer por duplicado. Tapar la placa e incubar 10min (± 2 min) a temperatura ambiente (18-25°C).
- Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.
- Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo, DILUIDO 1/10 según indicaciones previas. Tapar la placa e incubar 10 minutos (± 2 min) a temperatura ambiente (18-25°C).
- Lavar 4 veces la placa según procedimiento indicado.
- Añadir 100 µL de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción 5 minutos a temperatura ambiente sin exposición a la luz. Se recomienda la utilización una pipeta multicanal para este proceso a fin de agilizarlo lo más posible.
- Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo. Este reactivo debe añadirse siguiendo el mismo orden en que se añadió el sustrato.
- Leer a 450 nm en un lector de ELISA en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

PROCEDIMIENTO AUTOMÁTICO

- Antes de empezar el ensayo, equilibrar todos los componentes del kit a temperatura ambiente (al menos 2 horas). Si el ensayo se realiza en un sistema de ELISA automatizado, la distribución e identificación de muestras y controles (se recomiendan los duplicados) debe hacerse siguiendo cuidadosamente las instrucciones del fabricante. Seleccionar el número de pocillos o tiras requerido e introducirlos en el equipo.
- Dispensar 100 µL de suero control positivo y 100 µL de suero control negativo (listos para su uso) en dos pocillos.
- Dispensar 100 µL de muestra DILUIDA en los pocillos correspondientes. Incubar 60 min (\pm 2 min) a 26°C.
- Lavar 4 veces la placa según procedimiento descrito.
- Añadir 100 µL de conjugado a cada pocillo, DILUIDO 1/70 según indicaciones previas. Incubar 30 minutos (\pm 2 min) a temperatura ambiente (26°C).
- Lavar 4 veces la placa según procedimiento indicado.
- Añadir 100 µL de solución sustrato en cada pocillo. Mantener la reacción 15 minutos a temperatura ambiente (26°C) sin exposición a la luz.
- Añadir 100 µL de solución de frenado a cada pocillo.
- Leer a 450 nm en un lector de ELISA en los 5 minutos siguientes a la adición de la solución de frenado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La lectura se realiza a una longitud de onda de 450 nm. Si las muestras y controles se han ensayado por duplicado, hallar la media aritmética de las dos D.O. obtenidas (X).

A. VALIDACIÓN DEL ENSAYO

El kit se considerará válido cuando:

Control Positivo X (D.O.) \geq 0,80

Control Negativo X (D.O.) \leq Cut off negativo

B. PUNTOS DE CORTE

Cut off negativo= D.O. control positivo x 0,30

Cut off positivo= D.O. control positivo x 0,35

Se considerarán:

- muestras negativas si su D.O. es igual o inferior al cut off negativo.

- muestras positivas si su D.O. es igual o superior al cut off positivo.

- muestras dudosas si su D.O. se encuentra entre los dos cut off. En estos casos se recomienda valorar al animal a las 3-4 semanas; si su D.O. no aumenta por encima del cut off positivo, la muestra será negativa.

Si se titula el suero problema, el título será la última dilución cuya D.O. esté por encima del cut off positivo.

KIT COMPOSITION

<i>REAGENT</i>	<i>1 Plates</i>		<i>10 Plates</i>	
	Uni.	Vol.	Uni.	Vol.
Microtitration plates	1		10	
Vials containing Negative Control Sera, ready to use	1	3,5 mL	1	10 mL
Vials containing Positive Control Sera, ready to use	1	3,5 mL	1	10 mL
Vials containing concentrated peroxidase conjugate	1	1,5 mL	1	13 mL
Bottles with Washing Solution 10x concentrated	1	100 mL	8	250 mL
Bottles with Diluent (DE03-01), ready to use	1	125 mL	5	250 mL
Bottles with Substrate (TMB), ready to use	1	15 mL	3	60 mL
Bottles with Stop Solution, ready to use	1	15 mL	2	125 mL

OTHER MATERIALS AND REAGENTS NEEDED NOT PROVIDED WITH THE KIT

Distilled or deionized water.
Micropipettes from 5 to 200 µL.
Disposable micropipette tips.
Washing plates device.
Test tubes from 50 to 250 mL.
ELISA Reader (450 nm filter)

TECHNICAL BASIS

This kit is based on an indirect enzymatic immunoassay (Indirect ELISA). The technique is briefly described below: The recombinant antigen, specific of Leishmania antibodies, is fixed on polystyrene plates. When a sample contains Leishmania-specific antibodies, they will bind to the recombinant antigen adsorbed on the plate. After a washing step to eliminate all non-fixed material, the presence of dog antibodies can be detected using a specific peroxidase conjugate. After the addition of the substrate a colorimetric reaction will appear which can be measured by a spectrophotometer at 450nm. Please note that our kit uses recombinant antigen obtained by genetic engineering. This method warranties the total absence of infectivity in any of the components of the kit.

The assay, due to the use of an antigen that is not present in any of the vaccines currently on the market, can be considered a DIVA assay able of differentiating between vaccinated and infected animals. Under the current situation, there is no risk of vaccines interfering with the results. However, this situation could change in the future, so it is recommended to consider this possible scenario.

PRECAUTIONS AND WARNINGS FOR USERS

- Read the instructions for use carefully.
- Bring all reagents to room temperature at least during 2 hours prior to use. VERY IMPORTANT!
- Do not mix reagents or use instructions from different kits.
- Avoid any contamination of the reagents of the kit.
- Do not use components after expiry dates and do not mix components from different batches.
- There should be no eating, drinking or smoking when handling reagents or samples.
- Do not pipette by mouth.
- Use a new tip for each serum sample.
- Systematically include a positive control and a negative control each time the assay is run.
- Stop solution is a strong acid. Handle with care. In case of eye or skin contact, wash immediately with plenty of water.
- Substrate must be handled with care, as it is very sensitive to light and contamination. Remove only the volume to be used, with sterile tip or by decantation, and never return the leftover to the bottle.

STORAGE OF COMPONENTS

Store all plates and reagents between +2°C and +8°C, to keep them stable until expiry date.

INFORMATION ABOUT THE WASHING STEPS

The washing steps can be done using an automatic plate washer or a multichannel pipetting device suitable for dispensing 300 μ l on each well.

After the incubation periods, the washing steps must be done following the instructions below:

- Throw away the content of the plate by briskly turning the plate over in order to avoid the possible exchange of the contents from one well to another.
- Dispense a volume of 300 μ L of washing solution on each well.
- Shake the plate gently, avoiding cross-contamination between wells.
- Briskly turn the plate over to empty the wells.
- Repeat the process as many times as indicated in the kit's instructions.
- Prior to emptying the content of the plate in the last washing step, verify that the next reagent to be added is ready to use. Do not let the plate dry longer than strictly necessary.
- After the last washing step, tap the plate upside down on absorbent filter paper to remove any remaining washing solution.

PREPARATION OF SAMPLES

Sera samples must be tested at 1/100 dilution in diluent DE03-01 (i.e.: 5 μ L of serum + 495 μ L of serum diluent DE03-01). For titration we recommend assaying two-fold dilution from the 1/100.

PREPARATION OF REAGENTS

- Washing solution: Dilute one part of the concentrated washing solution provided in the kit with 9 parts of distilled or deionized water (100 mL of concentrated solution and 900 mL of water). Once prepared this solution remains stable when stored between +2°C and +8°C.
 - Control sera (+) and (-): Both controls are ready to use. Do not dilute.
 - Serum diluent: This reagent is ready to use. Do not dilute.
 - Conjugate: This reagent is concentrated. Dilute in supplied diluent depending on the followed procedure. Homogenize well the solution prior to use. Prepare only the needed quantity for one use, as leftover must be discarded.
- o Manual procedure: dilute 1/10:
- The necessary and sufficient quantity for a plate is 1100 μ L of conjugate in 9,900 mL of diluent.
 - The necessary and sufficient quantity for a 8 well strip is 100 μ L of conjugate in 0,900 mL of diluent.
- o Automated procedure: dilute 1/70:
- The necessary and sufficient quantity for a plate is 158 μ L of conjugate in 10,842 mL of diluent.
 - The necessary and sufficient quantity for a 8 well strip is 15 μ L of conjugate in 0,985 mL of diluent.

TEST PROCEDURE

MANUAL PROCEDURE

- Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (at least 2 hours).
- Add 100 μ L of positive control and 100 μ L of the negative control to each well (ready to use).
- Add 100 μ L of DILUTED sample into appropriate wells. Testing samples and controls in duplicates is recommended. Seal the plate and incubate for 10 minutes (\pm 2 min) at room temperature (18-25°C).
- Wash 4 times following the procedure previously described.
- Add 100 μ L of the 1/10 DILUTED conjugate to each well. Seal the plate and incubate for 10 minutes (\pm 2 min) at room temperature (18-25°C).
- Wash 4 times following the described procedure.
- Add 100 μ L of the substrate solution to each well. Keep the plate at room temperature for 5 minutes not exposed to light. In order to speed up this process, it is advisable to use a multichannel pipette.
- Add 100 μ L of the stop solution to each well. This reagent must be added following the same order in which the substrate was added.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 minutes after the addition of the stop solution.

AUTOMATED PROCEDURE

- Prior to starting the test, bring all reagents to room temperature (at least 2 hours). If performing the test on ELISA automatic systems, distribution and identification of samples and controls (duplicates recommended) should be established following manufacturer's instructions carefully. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.
- Add 100 µL of positive control and 100 µL of the negative control to each well (ready to use).
- Add 100 µL of DILUTED sample into appropriate wells.
- Incubate for 60 minutes (\pm 2 min) at 26°C.
- Wash 4 times following the procedure previously described.
- Add 100 µL of the 1/70 DILUTED conjugate to each well. Incubate for 30 minutes (\pm 2 min) at room temperature (26°C).
- Wash 4 times following the described procedure.
- Add 100 µL of the substrate solution to each well. Keep the plate at room temperature (26°C) for 15 minutes not exposed to light.
- Add 100 µL of the stop solution to each well.
- Read the OD of each well at 450 nm within 5 minutes after the addition of the stop solution.

READING AND RESULT INTERPRETATION

Measure and record the O.D. at 450nm for samples and controls. Determine the arithmetic mean (X) if test was performed in duplicates.

A. VALIDATION CRITERIA

Positive Control X (O.D.) \geq 0,80

Negative Control X (O.D.) \leq Negative cut off

B. INTERPRETATION

Negative cut off = O.D. positive control x 0,30

Positive cut off = O.D. positive control x 0,35

Samples will be considered:

- negative if its O.D. is equal or lower than the negative cut off.

- positive if its O.D. is equal or higher than the positive cut off.

- doubtful if its O.D. is between both cut off. In these cases, it is suggested to repeat the test after 3-4 weeks; if the O.D. remains lower than the positive cut off, sample will be considered as negative.

If titration of problem sample, title will be the last dilution showing an O.D. higher than the positive cut off.

Diseñado y fabricado en España por:

Designed & manufactured in Spain by:

GOLD STANDARD DIAGNOSTICS MADRID SA

C/Hermanos García Noblejas, 41 2ª planta

28037- MADRID (SPAIN)

Tif: +34 91368.05.01/04

Fax: +34 91 408.75.98

E-mail: info.spain@eu.goldstandarddiagnostics.com

www.goldstandarddiagnostics.com



CERTIFIED

MANAGEMENT SYSTEM
QUALITY - ISO 9001
ENVIRONMENTAL - ISO 14001

9191.INGE

9175.INGE

Distribuido en
Distributed in

por
by