



Prueba Rápida CL Detect™

Para Leishmaniasis Cutánea

La Prueba Rápida CL Detect™ es un ensayo cualitativo inmunocromatográfico para la detección rápida de antígenos de las especies de Leishmania en lesiones de la piel de un individuo sospechoso de tener Leishmaniasis cutánea. Esta prueba ha sido diseñada para probar especies del género *Leishmania* que causan Leishmaniasis cutánea (CL). Esta prueba está destinada al uso e interpretación por parte de personal capacitado en la toma de muestras.

Resumen y Explicación

Varias especies de *Leishmania* son responsables de la Leishmaniasis cutánea. En el Medio Oriente y Asia Central las especies predominantes responsables de la forma cutánea de Leishmaniasis son *L. major* y *L. tropica*. *L. donovani* y *L. infantum*, predominantemente conducen a formas viscerales de Leishmaniasis. En Irak, *L. major* es la causa principal de Leishmaniasis cutánea con la mayoría de casos reportados en el ejército debido a este agente. Es el agente principal de Leishmaniasis cutánea zoonótica (ZCL). En Afganistán, el principal agente de Leishmaniasis cutánea es *L. tropica* con una tasa de infección activa en Kabul de 2.7% pero las áreas del Norte de Afganistán también son endémicas para *L. major*. *L. tropica* es más frecuentemente asociada con la Leishmaniasis cutánea antroponótica (AZL). En el centro y sur de América *L. braziliensis*, *mexicana*, *amazonensis* y *panamensis* entre otras especies son frecuentes y responsables de la Leishmaniasis Cutánea.

Principio

La Prueba Rápida CL Detect para CL es un ensayo cualitativo basado en una membrana para la detección de antígenos presentes en amastigotes en lesiones de la piel de personas infectadas con el parásito *Leishmania*. La membrana es pre-cubierta con un anticuerpo policlonal purificado por afinidad a un antígeno amastigote (Peroxidoxin) en la zona de la línea de prueba y un anticuerpo IgG anti-ratón de Cabra en la zona de la línea de control. Durante la prueba, la muestra aspirada reacciona con el tinte conjugado (anticuerpo monoclonal contra el antígeno de amastigote) que ha sido recubierto en el dispositivo de la prueba. La mezcla migra hacia arriba en la membrana cromatográficamente por acción capilar para reaccionar con el anticuerpo de conejo purificado por afinidad en la membrana y genera una línea roja. La presencia de esta línea roja indica un resultado positivo, mientras que su ausencia indica un resultado negativo. Independientemente de la presencia de antígenos de amastigote, como la mezcla continúa migrando a través de la membrana en la zona del anticuerpo IgG anti-ratón de Cabra inmovilizado, una línea roja en la zona de la línea de control

aparecerá siempre. La presencia de esta línea roja sirve como verificación de volumen de muestra suficiente y flujo adecuado y como control para los reactivos.

Precauciones

- No use después de la fecha de caducidad.
- No utilice suero, plasma o sangre entera con esta tira de prueba.
- Maneje todas las muestras y los kits utilizados como si contuvieran agentes infecciosos. Observe las precauciones establecidas contra los riesgos microbiológicos en el desempeño de todos los procedimientos y siga los procedimientos estándar para la eliminación adecuada de las muestras y los kits utilizados.
- Use ropa adecuada y guantes desechables mientras realiza el ensayo. Lávese bien las manos cuando haya terminado.
- Evite el contacto entre sus manos y los ojos o las membranas mucosas durante la prueba.
- No coma, beba o fume en el área donde los sueros y los kits se manipulan.
- El buffer de detección contiene un preservativo; evite todo contacto posible con la piel y las mucosas. El buffer de lisis contiene detergentes y no debe estar en contacto con la piel ni ser ingerido.

Almacenamiento

El frasco o bolsa sellada que contiene la tira de prueba está diseñado para ser almacenado a temperatura ambiente (20°C - 30°C) durante el tiempo de su vida útil. Los frascos que contienen el buffer de detección y el buffer de lisis se han diseñado para ser almacenados a temperatura ambiente durante la duración de su vida útil.

Las tiras no deben ser congeladas.

La prueba debe ser utilizada inmediatamente después de retirarla de la bolsa o frasco para prevenir la exposición a la humedad.

Recolección de Muestras

- El suero humano no debe ser probado con esta tira de prueba.
- Las muestras se recogerán en una taza de muestra provista.
- Las muestras serán tratadas con 3 gotas de buffer de lisis en la preparación de la prueba. En todos los casos, asegúrese que el buffer de lisis y el material estén bien mezclados.
- La prueba debe ser realizada tan pronto como sea posible después de la recolección. No deje las muestras a temperatura ambiente por periodos prolongados. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C hasta por 1 día. De lo contrario se deben almacenar por debajo de -20°C.
- Lleve la muestra a temperatura ambiente antes de la prueba. Las muestras congeladas deben descongelarse completamente antes de la prueba. Las muestras no deben ser congeladas y descongeladas repetidamente.
- Si las muestras deben ser enviadas, deben ser empacadas cumpliendo las regulaciones federales que cubren el transporte de agentes infecciosos.

Preparación de la Lesión: La muestra debe ser obtenida por personal capacitado en la toma de muestras. Tenga en cuenta que la lesión debe ser inferior a 2 meses. Las directrices para preparar la lesión y obtener una muestra, se describen a continuación:

- Limpie a fondo la lesión y la piel circundante mediante un lavado con agua y detergente.
- Desbride usando fórceps para aplicar una gasa empapada en solución salina estéril de 0.9%. Frote hasta que la corteza sea extraída en su totalidad, dejando la lesión con aspecto de “piel de bebé”.
- Una vez que la lesión esté preparada, se puede obtener una muestra por personal capacitado en la toma de muestras. A continuación hay dos métodos que han sido clínicamente probados para dar buenos resultados:

Procedimiento de Aguja Dental

- Retire la aguja dental del empaque individual.
- En el borde de la lesión, inserte la lengüeta en la lesión a una profundidad aproximada de la mitad de la longitud de la lengüeta de la úlcera en la zona inflamada.
- Presione con el pulgar sobre la piel donde la aguja fue insertada.
- Gire suavemente (giro) la aguja dos veces (para adelante y para atrás 2 veces).
- Retire la aguja con un tirón fuerte, rápido, mediante una torsión ligera.
- Colóquela hacia abajo en un recipiente de recolección con 3 gotas de buffer de lisis.
- Gire la lengüeta para retirar el material celular tanto como sea posible.
- Asegúrese que el buffer de lisis y el material están bien mezclados.

Procedimiento de Raspado Dérmico

- Separe la hoja de bisturí estéril del empaque. Tenga en cuenta que esto no es provisto con este kit.
- Levante el labio necrótico de la lesión para llegar a la zona por debajo del límite activo de la úlcera.
- Raspe la dermis superior 4 veces desde el interior en un movimiento hacia afuera con el borde del bisturí de la hoja.
- Deposite las manchas de tejido y jugo directamente en la superficie de la hoja en un recipiente de recolección provisto con este kit, lavando con 3 gotas de buffer de lisis.
- Asegúrese que el buffer de lisis y el material estén bien mezclados.

Contenido del Kit

La membrana de la tira de Prueba Rápida CL Detect™ es recubierta con un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, que reacciona con amastigotes de *Leishmania* en la zona de la línea de prueba y el anticuerpo IgG anti-ratón de Cabra en la zona de la línea de control. Se detecta con un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal en el mismo antígeno.

El kit contiene lo siguiente:

1. Veinticinco (25) Tiras de Prueba reactivas embolsadas individualmente o veinticinco (25) tiras de prueba en un frasco con desecante en la tapa.
2. Un (1) frasco de buffer de lisis, 6 ml
3. Un (1) frasco de solución de buffer de detección, 6 ml
4. Veinticinco (25) tazas de muestra.
5. Veinticinco (25) tazas de reacción. (Idénticas a las tazas de muestra.)
6. Veinticinco (25) agujas dentales estériles.

Materiales requeridos pero *no* provistos:

1. Escalpelos
2. Bisturí.
3. Mini pipeta

Procedimiento de la Prueba

1. Recoja la muestra de lesión de la piel como se describe en la sección Recolección de la Muestra de este inserto.
2. Deje que la muestra alcance la temperatura ambiente antes de la prueba.
3. Retire la Prueba Rápida CL Detect™ para CL de la bolsa de papel aluminio.
4. Añada 20 µl de la muestra a la tira de la prueba en el área debajo de la flecha usando una mini pipeta.
5. Añada 3 gotas de la solución de buffer de detección suministrada con este kit de prueba en la taza de reacción.
6. Coloque la tira de la prueba en la taza de reacción para que el extremo de la tira esté hacia abajo según lo indicado por las flechas de la tira.
7. Lea los resultados en 20-30 minutos. Es significativo que el fondo sea claro antes de leer la prueba, especialmente cuando las muestras tienen niveles bajos de antígeno, y sólo una banda débil aparece en la región de prueba (T). Los resultados interpretados después de 30 minutos pueden ser engañosos.

Nota: No pruebe este producto con solución de buffer de detección sola, 20µl de la muestra lisada se deben agregarse en primer lugar.

Interpretación de Resultados

Un Resultado Positivo

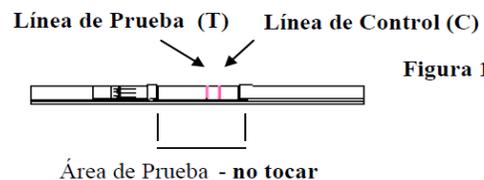


Figura 1

La prueba es positiva cuando la línea de prueba y la línea de control aparecen en el área de prueba como se muestra en la Figura 1. Un resultado positivo indica que la Prueba Rápida CL Detect detectó antígenos presentes en amastigotes. Una línea débil es considerada como resultado positivo.

Como guía para interpretación, el color rojo en la zona de prueba variará dependiendo de la concentración de antígenos presentes. La línea de prueba para muestras “débilmente positivas” puede mostrar resultados entre una línea roja débil positiva con un rojo tenue, casi fondo blanco. (Las muestras “débilmente positivas” son aquellas con bajas concentraciones de antígeno.)

Un Resultado Negativo

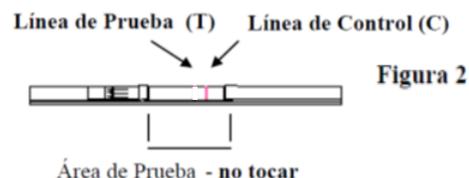


Figura 2

La prueba es negativa cuando sólo la línea de control aparece.

Un resultado negativo indica que la tira reactiva CL *Detect*TM no detecta antígenos en la muestra. Ninguna línea de prueba está presente como en la Figura 2.

Un Resultado Inválido

Ninguna línea aparece en las áreas de línea de prueba o control. La prueba es también inválida si no aparece ninguna línea de control, pero una línea de prueba es vista. Se recomienda volver a probar usando una nueva Prueba Rápida CL *Detect* para Leishmaniasis Cutánea y una nueva muestra fresca.

Nota: El color rojo en el área de prueba variará dependiendo de la concentración de antígeno Leishmania presente. Sin embargo, ningún valor cuantitativo ni la tasa de incremento en antígeno puede ser determinado por esta prueba cualitativa.

Características del Desempeño

Comparación de la Prueba Rápida CL *Detect* con la microscopía para método de recolección de Aguja Dental 59 muestras fueron recolectadas de individuos con lesiones en la piel con Leishmaniasis cutánea usando un dispositivo de recolección de aguja dental. Las muestras fueron recolectadas bajo IRB en sitios en Túnez y fueron típicamente de lesiones <2 meses. Las muestras fueron recolectadas en buffer de lisis y probadas en la Prueba Rápida CL *Detect*. El frotis para microscopía fue también obtenido del raspado de la misma lesión. La siguiente tabla indica la relación de reactividad de la Prueba Rápida CL *Detect*TM con microscopía (escala OMS) cuando el dispositivo de recolección de muestra con aguja dental fue utilizado.

CL <i>Detect</i> TM	Microscopía (OMS)	
	Aguja Dental	
+	53	2
-	0	4(16)

() Sin muestras de Control CL

Sensibilidad	53/53	100%
Especificidad	20/22	90.95%
PPV	53/55	96.40%
NPV	20/20	100%
Exactitud	73/75	97.30%

Control de Resultados Negativos

En un estudio independiente las muestras de lesiones de la piel que no son debido a Leishmaniasis fueron recolectadas usando la aguja dental. Hasta las fechas, 16 muestras sin lesiones de la piel CL han sido probadas usando el método de recolección con Aguja Dental. Todas fueron negativas por Prueba Rápida CL *Detect* y Microscopía para parásitos Leishmania.

Limitaciones

- Esta prueba sólo indicará la presencia de antígenos de parásitos Leishmania en pacientes con Leishmaniasis Cutánea y no debe utilizarse como un solo criterio para el diagnóstico de Leishmaniasis.

Esta prueba sola no debe ser usada para cualquier decisión de tratamiento clínico. Como con todas las pruebas diagnósticas, todos los resultados deben ser considerados con otra información clínica disponible para el médico.

- Si el resultado es negativo y los síntomas clínicos persisten, se recomienda realizar pruebas adicionales con otros métodos clínicos. Un resultado negativo no evita la posibilidad de Leishmaniasis.

- Un resultado falso positivo podría ocurrir. Las pruebas de confirmación (por ejemplo, por cultivo) se aconsejan especialmente en casos donde no hay síntomas.

- No use muestras de suero.

Referencia

1. Martin SK, Thuita-Harun L, Adoyo-Adoyo M, Wasunna KM. 1998. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. *Ann Trop Med Parasitol*. 92: 571-7
2. Ryan JR, Smithyman AM, Stiteler JM, Rowton ED, Valli L, Orndorff GR, Seaman J, Thuita-Harun L and Martin SK. An ELISA based on soluble promastigote antigen detects IgM and IgG antibodies in visceral and cutaneous leishmaniasis. Abstract to November, 1998
3. Ryan JR, Rajasekariah GH, Thuita-Harun L, Yi L, Smithyman AM, Kinnamon KE, and Martin SK. The potential use of antigens shed, excreted and secreted by *Leishmania donovani* promastigotes for antigen detection tests for leishmaniasis. Abstract to December, 1999 American Society for Tropical Medicine and Hygiene Meeting, Washington, DC
4. Adoyo MA, Magiri CG, Ryan JR, Martin SK, Mason CJ and Wasunna KM. Preliminary applications of an antibody capture ELISA to monitor leishmaniasis therapy. Abstract to December, 1999 American Society for Tropical Medicine and Hygiene Meeting, Washington, DC
5. Mimori T, Matsumoto T, Calvopina MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, Nonaka S, Shamsuzzaman SM and Hashiguchi Y. Usefulness of sampling with a cotton swab for PCR diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop* 2002; 81(3): 197-202.
6. Marques MJ, Volpini AC, Genari O, Mayrink W and Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and DNA extraction from human lesions for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(6): 902-6.
7. Mallik MK, Das DK and Haji BE. Fine needle aspiration cytology diagnosis of cutaneous leishmaniasis in a 6-month-old child: a case report. *Acta Cytol* 2001; 45(6): 1005-7.
8. Ramirez JR, Aguledo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D and Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Columbia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(10): 3768-73.
9. Matsumoto T, Hashiguchi Y, Gomez EA, Calvopina MH, Nonaka S, Saya H and Mimori T. Comparison of PCR results using scrape/exudates, syringe-sucked fluid and biopsy samples

for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999; 93(6):606-7.

10. Mohareb EW, Hanafi HA, Mikhail EM, Presley SM and Batchelor R. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for the detection of *Leishmania* promastigotes and amastigotes in sand flies and lesion fluid aspirates. *J Egypt Soc Parasitol.* 1998; 28(2): 313-21

11. Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, Reed SG. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* Immun. 1998; 66(7): 3279-89.

12. Rafati S, Salmanian AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S and Fasel N. Identification of *Leishmania major* cysteine proteases as targets of the immune response in humans. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 113(1) 35-43.

13. de Ibarra AA, Howard JG and Snary D. Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major*: specificities and antigen location. *Parasitology* 1982; 85(3): 523-31.

14. Greenblatt CL, Slutzky GM, de Ibarra AA and Snary D. Monoclonal antibodies for serotyping *Leishmania* strains. *J Clin Microbiol.* 1983; 18(1): 191-3.

15. Handman E, Greenblatt CL and Goding JW. An ampipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *EMBO J* 1984; 3(10): 2301-6.

16. Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diag Microbiol and Inf Dis* 2002; 42: 251-256.

17. Beena KR, Ramesh V and Mukherjee A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 616-620.

18. Chargui N, Bastien P, Kallel K et al Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* 2005; 99, 762-768.

19. Robinson Ramirez J, Agudelo S, Muskus C et al Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Columbia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J. Clin Micro.* 2000; 38(10): 3768-3773.

20. Kassi M, Tareen I, Qazi A and Kasi PM. Fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Ann Saudi Med.* 2004; 24(2): 93-97.

21. Sharquie KE, Hassen AS, Hassan SA, Al-Hamami IA. Evaluation of diagnosis of cutaneous leishmaniasis by direct smear, culture and histopathology. *Saudi Med J.* 2002; 23(8): 925-928.

22. Navin TR, Arana FE, deMerida AM, Arana BA, Castillo AL and Silvers DN. Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: A comparison of Diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 42(1): 36-42.

Fecha de Vigencia: 12/22/2011



Representante Europeo Autorizado

CEpartner4U
Esdoornlaan 13
3951 DB Maarn
The Netherlands



Distribuidor Exclusivo para Colombia



Icosan Internacional Ltda.
Carrera 20 # 169-25
World Trade Center: Calle 100 No 8A – 37
Torre A, Oficina 703.
Bogotá DC, Colombia.
Teléfonos: + (57 1) 6774991
E-mail: soporte@icosan.com.co
info@icosan.com.co

InBios International, Inc.
562 1st Avenue South, Suite 600
Seattle, WA 98104 USA
Toll Free USA- 1-866-INBIOS1
206-344-5821 (Internacional)
www.inbios.com
Número de Parte del Inserto: 900121
CL015, CL020, CL025, CL050