

RIDASCREEN® Leishmania IgG
Art. n. K7321



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDASCREEN® Leishmania IgG è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG specifici contro *Leishmania infantum* in siero umano.

Il test deve essere utilizzato a scopo di conferma quando vi è un caso sospetto di leishmaniosi.

2. Sintesi e spiegazione del test

Dopo l'infezione da *Leishmania*, il sistema immunitario risponde con la formazione di anticorpi specifici contro il patogeno. Utilizzando i metodi immunologici, è possibile determinare gli anticorpi nel siero. Il metodo analitico utilizzato e la scelta dell'antigene patogeno-specifico hanno entrambi una correlazione significativa con la significatività del test.

3. Principio del test

Una piastra da microtitolazione è rivestita con l'antigene ricombinato purificato di *Leishmania infantum*. Gli anticorpi presenti nei campioni dei pazienti si legano all'antigene e vengono determinati durante la seconda fase di incubazione utilizzando anticorpi anti-umani marcati con l'enzima (il coniugato). L'enzima converte il substrato incolore (perossido di urea/TMB) in un prodotto finale blu. La reazione enzimatica viene interrotta aggiungendo acido solforico e il colore della miscela passa contemporaneamente da blu a giallo. La misurazione finale viene eseguita a 450 nm su un fotometro usando la lunghezza d'onda di riferimento di ≥ 620 nm in un periodo di 20 minuti dall'aggiunta del reagente bloccante.

4. Reagenti forniti

Tab. 1: contenuto della confezione (una confezione include reagenti sufficienti per 96 determinazioni)

			K7321 IgG
Plate	96 test	Piastra da microtitolazione, 12 strisce di micropozzetti (separabili) in telaio di fissaggio; rivestite con antigeni ricombinanti da <i>Leishmania infantum</i>	X
Diluent	100 ml	Tampone del campione, soluzione di NaCl tamponata con fosfato, pronta per l'uso	X
SeroWP	100 ml	Tampone di lavaggio, concentrato 10 volte; soluzione NaCl tamponata con Tris	X
Control IgG + <i>tappo rosso</i>	1,2 ml	Controllo positivo IgG, siero umano, pronto per l'uso	X
Control IgG - <i>tappo incolore</i>	1,2 ml	Controllo negativo IgG, siero umano, pronto per l'uso	X
Control IgG co <i>tappo blu</i>	2,5 ml	Controllo cut-off IgG, siero umano, pronto per l'uso	X
Conjugate <i>tappo arancione</i>	12 ml	coniugato IgG anti-umane, pronto per l'uso; coniugato IgG anti-umane, coniugato con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata	X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto per l'uso	X
Stop	12 ml	Reagente bloccante acido solforico 0,5 M; pronto per l'uso	X

I dettagli sulle sostanze pericolose sono conformi ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli: Per le schede di dati di sicurezza (SDS) o informazioni sul prodotto consultare www.r-biopharm.com.

5. Istruzioni di conservazione

Il kit del test deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito può essere usato per un massimo di 4 settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C o per 5 giorni se conservato a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C). Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.

La busta in alluminio contenente la piastra da microtitolazione deve essere aperta in modo tale da non strappare la chiusura a clip. Le strisce di micropozzetti inutilizzate devono essere conservate nella busta in alluminio. I reagenti non devono essere contaminati e il substrato incolore deve essere protetto dall'esposizione alla luce diretta.

6. Materiale necessario ma non fornito

6.1. Reagenti

- acqua distillata o deionizzata

6.2. Accessori

- Provette
- Vorticatore
- Micropipette con volume da 10-100 µl e 100-1000 µl
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per micropiastre o pipetta multicanale
- Lettore di micropiastre (450 nm, lunghezza d'onda di riferimento ≥ 620 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5%

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

I sieri di controllo presenti nel kit (controllo positivo, controllo cut-off e controllo negativo) sono stati testati per HIV-Ab, HCV-Ab e HbsAg con risultati negativi. Tuttavia, devono essere trattati come potenzialmente infettivi analogamente ai campioni dei pazienti e a tutti gli altri materiali con cui vengono a contatto e devono essere maneggiati secondo le disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Il test è stato sviluppato per testare campioni di siero umano. Dopo il prelievo di sangue, questo deve essere separato il prima possibile dai coaguli per evitare l'emolisi. I campioni devono essere conservati refrigerati o congelati fino al momento di eseguire il test. Evitare in ogni modo il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni e la contaminazione microbica. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può causare risultati errati.

Tab. 2: conservazione del campione

Siero non diluito		Siero diluito
2 - 8 °C	-20 °C	2 - 8 °C
1 settimana	>1 settimana	7 ore

9. Esecuzione del test

9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione devono essere portati a temperatura ambiente

(20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce di micropozzetti devono essere estratte dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente.

Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, il kit deve essere immediatamente riportato alla temperatura di conservazione di 2 - 8 °C. Prendere solo il volume di reagenti necessario per la procedura del test. Non rimettere i reagenti nei flaconcini perché potrebbe verificarsi una contaminazione del reagente. Non rimettere i reagenti nei flaconcini perché questa operazione potrebbe comportarne la contaminazione.

Le strisce di micropozzetti non possono essere utilizzate più di una volta. I reagenti e le strisce di micropozzetti non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o se i flaconcini non sono ermetici.

Il tampone di lavaggio, il tampone del campione, il reagente bloccante e il substrato non sono specifici del test; possono anche essere usati per altri dosaggi RIDASCREEN® ELISA per la determinazione di anticorpi contro i parassiti.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **SeroWP** viene miscelata con 9 parti di acqua distillata. Per compiere questa operazione, versare 100 ml di concentrato in un cilindro graduato da 1000 ml e aggiungere acqua distillata fino a ottenere 1000 ml. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a +37 °C per scioglierli. Il tampone diluito può essere utilizzato per un massimo di 4 settimane purché conservato a 2 - 8 °C o per 5 giorni se conservato a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparazione dei campioni

Diluire i campioni di siero da testare con il tampone del campione **Diluent** 1:50 prima di iniziare il test.

Per esempio 10 µl di siero + 490 µl di diluente

Nota:

Il controllo negativo, il controllo cut-off e il controllo positivo sono pronti per l'uso e NON devono essere diluiti.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver inserito un numero sufficiente di pozzetti nel telaio, pipettare 100 µl di sieri diluiti e controlli pronti all'uso negativi **Control IgG -**, di cut-off **Control IgG | co** e positivi **Control IgG +** in ciascuno dei corrispondenti pozzetti e incubare a temperatura ambiente (20 - 25 °C) per 15 minuti. Si consiglia di eseguire in duplicato il controllo di cut-off **Control | co**.

9.5. Lavaggio

I pozzetti devono essere svuotati in un contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi, tamponare la piastra su carta assorbente per eliminare l'umidità residua. In seguito, lavare la piastra 5 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio. Dopo ciascun lavaggio, assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati tamponandoli sulla parte inutilizzata del foglio di carta assorbente.

Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio per micropiastre, accertarsi che la macchina sia regolata correttamente sul tipo di piastra impiegato. Dopo il lavaggio, tamponare la piastra capovolta su un foglio di carta assorbente pulito per eliminare l'eventuale umidità residua.

9.6. Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato di IgG anti-umane **Conjugate** in ogni pozzetto. Quindi incubare la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.7. Lavaggio

Lavare 5 volte in conformità con la Sezione 9.5.

9.8. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **SeroSC** a ogni pozzetto. Quindi incubare la piastra per 15 minuti a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Arrestare quindi la reazione aggiungendo 50 µl di reagente bloccante **Stop** a ogni pozzetto ed effettuare la misurazione a 450/620 nm per 20 minuti.

10. Controllo della qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento

Per il controllo della qualità, ogni volta che si effettua il test, devono essere utilizzati il controllo negativo, il controllo di cut-off e il controllo positivo. Il controllo di cut-off deve essere usato in duplicato e se le due misurazioni individuali si discostano dalla media di oltre il 25%, il test deve essere ripetuto. Il test è stato eseguito correttamente quando le estinzioni medie dei controlli soddisfano i seguenti criteri:

Tab. 3: criteri di controllo della qualità

	OD
controllo negativo	< 0,15
controllo di cut-off	0,2 - 0,5
controllo positivo	≥ indice 20

Se i valori differiscono da quelli richiesti, se il substrato è torbido o è diventato blu prima dell'aggiunta ai pozzetti, questo può indicare che i reagenti sono scaduti.

Se i valori fissati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test
- Controllo visivo che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite:
non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al distributore R-Biopharm locale.

11. Valutazione e interpretazione

11.1. Calcolo dell'indice del campione

1. Si calcola l'assorbanza media per il controllo di cut-off.
2. L'indice del campione si ottiene dividendo l'assorbanza del campione per il cut-off.

Per esempio: Controllo di cut-off 1 O.D. = 0,44
 Controllo di cut-off 2 O.D. = 0,42
 Campione O.D. = 1,591

$$\text{Controllo di cut-off valore medio} = \frac{OD \text{ Cut-off } 1 + OD \text{ Cut-off } 2}{2} = \frac{0,44+0,42}{2} = 0,43$$

$$\text{Indice del campione} = \left(\frac{OD \text{ campione}}{OD \text{ controllo cut-off valore medio}} \right) * 10 = \left(\frac{1,591}{0,43} \right) * 10 = 37$$

11.2. Risultato del test

Tab. 4: valutazione dell'indice del campione

	negativo	dubbio	positivo
Indice del campione	< 9	9 - 11	> 11

12. Limiti del metodo

Il dosaggio immunoenzimatico RIDASCREEN® Leishmania determina anticorpi IgG specifici contro *Leishmania infantum* e deve essere eseguito nei casi di sospetta leishmaniosi. I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in combinazione con il quadro clinico e altri riscontri diagnostici.

I segnali anticorpali dipendono dalla localizzazione della parassitosi e possono variare da paziente a paziente.

Nei seguenti casi, si possono avere risultati dubbi e debolmente positivi:

- soggetti che sono stati punti da flebotomi infetti (mosche della sabbia) nelle regioni in cui la malattia è endemica e producono bassi titoli anticorpali senza manifestare l'infezione
- soggetti guariti o appena guariti dall'infezione asintomatica, cosicché i loro titoli anticorpali sono ancora bassi
- soggetti che hanno avuto la malattia in passato e continuano a produrre titoli residui
- soggetti nelle prime fasi della malattia
- fattori che sono non identificabili e non specifici

Questi casi devono essere riesaminati testando un altro campione, considerando i sintomi clinici e utilizzando altri metodi diagnostici. In assenza di altre diagnosi esatte, il test deve essere ripetuto dopo due o quattro settimane con un nuovo campione.

I soggetti che hanno avuto la malattia acuta o hanno appena sofferto della malattia possono fornire risultati medi e alti positivi. Titoli anticorpali ancora più elevati possono essere prodotti dopo infezioni di durata maggiore avvenute in passato.

Nei casi che non sono chiari, il risultato deve essere interpretato alla luce dell'anamnesi clinica, dei sintomi clinici e di altri metodi diagnostici.

Un risultato negativo non esclude necessariamente la leishmaniosi. Durante le prime fasi dell'infezione, il numero di anticorpi può essere molto ridotto al punto che il test produce un risultato negativo. Se si sospetta la leishmaniosi in base all'anamnesi clinica, si deve testare un altro campione di siero dopo quattro settimane.

In alcuni casi, in Sud America è stata osservata una reazione crociata con sieri contenenti anticorpi contro *T. cruzi* (malattia di Chagas). Questa situazione va tenuta in considerazione quando si effettua il test in aree del Sud America dove la malattia di Chagas è endemica.

Un risultato positivo non esclude la presenza di un altro patogeno infettivo.

13. Prestazioni e caratteristiche

Tab. 5: variazione inter-dosaggio (n = 30)

Variazione inter-dosaggio	IgG	
	Indice	CV
Siero 1	44,7	5,8%
Siero 2	15,4	9,6%
Siero 3	13,1	8,3%
Siero 4	0,6	non disponibile

Tab. 6: variazione intra-dosaggio (n = 23)

Variazione intra-dosaggio	IgG	
	Indice	CV
Siero 1	39,1	3,0 %
Siero 2	15,7	3,6 %
Siero 3	12,3	2,0 %
Siero 4	0,2	non disponibile

Tab. 7: sensibilità e specificità rispetto ad altri tre dosaggi ELISA disponibili in commercio

	IgG
Sensibilità	100%
Specificità	100%

Tab. 8: risultato dei test su 200 sieri di donatori di sangue prelevati da un centro donatori di sangue in Germania










200 sieri di donatori di sangue	IgG
negativo	100%
dubbio	0%
positivo	0%

14. Cronologia delle versioni



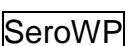
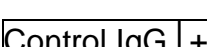
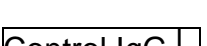
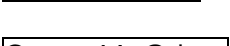
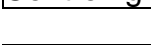
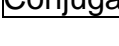

Numero della versione	Capitolo e designazione
15-12-2017	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel testo

	Piastra da microtitolazione
	Tampone del campione
	Tampone di lavaggio 10x
	Controllo positivo IgG
	Controllo negativo IgG
	Controllo di cut-off IgG
	Coniugato di IgG anti-umane
	Substrato TMB
	Reagente bloccante

16. Bibliografia

1. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 605-609 (1966).
2. *Bray, R.S. and Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, 490-505 (1967).
3. *Bray, R.S.*, Ecol. Dis., 4, 257-267 (1982).
4. *Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. and Lanotte, G.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 72, 213-218 (1978).
5. *Kager, P.A., Rees, P.H., Welde, B.T., Hockmeyer, W.T. and Lyerly, W.H.*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 556-559 (1981).
6. *Lainson, R.*, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 569-596 (1983).
7. *Low-A-Chee, R.M., Rose, P. and Ridley, D.S.*, Ann. Trop. Med. Parasitol., 77, 255-260 (1986).
8. *Ranque, J. and Quilici, M.*, Journal of Parasitology, 56, 277-278 (1970).