

RIDASCREEN® Hantavirus Puumala IgG, IgM

REF K9221
K9231



1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. I test RIDASCREEN® Hantavirus Puumala sono test immunoenzimatici per la determinazione quantitativa degli anticorpi IgG o IgM diretti contro l'hantavirus Puumala nel siero umano.

I test sono indicati solo nei casi di sospetta infezione da hantavirus.

2. Sintesi e spiegazione del test

Tassonomicamente, l'hantavirus fa parte della famiglia Bunyaviridae. È un virus a RNA rivestito. L'RNA è presente come singolo filamento in tre segmenti a forma di anello (1,2). Gli hantavirus si trovano in tutto il mondo. Tuttavia, esistono distribuzioni geografiche per le singole specie in base ai serbatoi ospiti sierotipo-specifici. Le specie Puumala e Dobrava-Belgrado e Hantaan sono proprie dell'Eurasia (3). Il serbatoio dell'agente patogeno è costituito da roditori infetti in modo persistente e asintomatico, ad esempio topi che espellono grandi quantità del patogeno attraverso urina, feci e saliva. Gli agenti patogeni vengono trasmessi all'uomo attraverso l'infezione da contatto o per inalazione di aerosol contenente feci o urina (1). Oltre a innocui sintomi influenzali, l'infezione da hantavirus può causare febbre emorragica con sindrome renale (nefropatia epidemica, HFRS) o coinvolgimento polmonare (sindrome polmonare da hantavirus (HPS)). La mortalità dipende in larga misura dal ceppo virale e dalla gravità dell'infezione (4,5). La risposta immunitaria umorale è diretta principalmente contro l'antigene del nucleocapside di hantavirus. Nei metodi di determinazione sensibili, gli anticorpi IgM possono essere rilevati fin da quando i sintomi clinici iniziano a manifestarsi. È generalmente possibile rilevare gli anticorpi IgG due settimane dopo l'infezione (5).

3. Principio del test

La proteina NEV-N ricombinante della specie hantavirus Puumala è legata alla superficie dei pozzetti nelle strisce di microtitolazione. I campioni diluiti e i controlli sono pipettati in questi pozzetti e incubati a 37 °C. Gli anticorpi esistenti si legano agli antigeni immobilizzati. Il materiale non legato viene rimosso mediante lavaggio. In seguito viene aggiunto un anticorpo anti-umano coniugato con perossidasi (anti-IgG o anti-IgM). Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Quindi viene aggiunto il substrato (H₂O₂/TMB) che sviluppa una colorazione blu nei campioni positivi con l'enzima legato. La reazione viene interrotta aggiungendo il reagente bloccante. Questa aggiunta fa virare il colore da blu a giallo. La misurazione finale viene eseguita in un fotometro a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 nm) entro 20 minuti.

4. Reagenti forniti

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti nel kit sono sufficienti per 96 determinazioni).

			K9221 IgG	K9231 IgM
Plate	96 test	Piastra da microtitolazione; 12 strisce da microtitolazione (separabili) su telaio di fissaggio, rivestite con antigene di hantavirus	X	X
SeroPP <i>Tappo trasparente</i>	110 ml	Tampone di diluizione, pronto per l'uso; soluzione salina tamponata con fosfato, di colore giallo	X	X
SeroWP	100 ml	Tampone di lavaggio, concentrato 10 volte; soluzione salina tamponata con Tris	X	X
Control IgG + <i>Tappo verde</i>	2,5 ml	IgG controllo standard, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore verde	X	
Control IgM + <i>Tappo rosso</i>	2,5 ml	IgM controllo standard, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore rosso		X
Control IgG - <i>Tappo trasparente</i>	1,2 ml	IgG controllo negativo, pronto all'uso; siero umano diluito	X	
Control IgM - <i>Tappo trasparente</i>	1,2 ml	IgM controllo negativo, pronto all'uso; siero umano diluito		X
Control IgG A <i>Tappo verde</i>	1,2 ml	IgG controllo di qualità A, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore verde	X	
Control IgG B <i>Tappo verde</i>	1,2 ml	IgG controllo di qualità B, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore verde	X	
Control IgM A <i>Tappo rosso</i>	1,2 ml	IgM controllo di qualità A, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore rosso		X
Control IgM B <i>Tappo rosso</i>	1,2 ml	IgM controllo di qualità B, pronto all'uso; siero umano diluito, di colore rosso		X
SeroG LD <i>Tappo verde</i>	12 ml	Coniugato di anti-IgG umane LD (capra); pronto all'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata	X	
SeroM LD <i>Tappo rosso</i>	12 ml	Coniugato di anti-IgM umane LD (capra); pronto all'uso; anticorpi coniugati con perossidasi in soluzione proteica stabilizzata		X
SeroSC	12 ml	Substrato H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto all'uso	X	X
Stop	12 ml	Reagente bloccante; acido solforico 1 N; pronto all'uso	X	X

Le informazioni sulle sostanze pericolose sono conformi ai requisiti di etichettatura. Ulteriori dettagli quali le schede di sicurezza (SDS) e le informazioni sul prodotto sono disponibili all'indirizzo www.r-biopharm.com

5. Istruzioni di conservazione

Il kit del test può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta quando conservato a 2 - 8 °C. Il tampone di lavaggio diluito ha una durata di conservazione di quattro settimane se conservato a 2 - 8 °C e di cinque giorni se conservato a temperatura ambiente

(20 - 25 °C). Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.

Aprire la busta di alluminio contenente la piastra da microtitolazione senza rimuovere la chiusura a clip. Riporre immediatamente le strisce di microtitolazione non necessarie nella busta in alluminio sigillata e conservarle a 2 - 8 °C.

Prevenire la contaminazione dei reagenti e impedire che il substrato incolore sia colpito dalla luce diretta.

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata
- RF-Absorbens per le determinazioni IgM (come RIDA[®] RF-Absorbens, Art. n. Z0202)

6.2. Accessori

- Provette per i campioni
- Incubatore 37 °C
- Vorticatore
- Micropipette per volumi di 10 - 100 µl e 100 - 1000 µl
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Dispositivo di lavaggio per piastre da microtitolazione o pipette multicanale
- Fotometro per piastre da microtitolazione (450 nm, filtro di riferimento ≥ 620 nm)
- Carta da filtro (salviette da laboratorio)
- Contenitore per rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Avvertenze e misure precauzionali

Esclusivamente per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito solo da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi scrupolosamente alle istruzioni per l'uso per l'esecuzione del test. Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per ulteriori dettagli consultare le schede dati di sicurezza (SDS) su www.r-biopharm.com.

Gli utenti sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Seguire le norme nazionali sullo smaltimento.

I sieri di controllo presenti nel kit (controllo standard, controllo negativo, controllo di qualità A e B) sono stati testati per HIV Ab, HCV Ab e HBsAg e sono risultati negativi. Tuttavia devono essere trattati come potenzialmente infetti allo stesso modo dei campioni dei pazienti e di tutti i materiali con cui si viene a contatto, e devono essere manipolati secondo le norme di sicurezza nazionali pertinenti.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Questo test è stato sviluppato per l'esame di campioni di siero umano. Dopo il prelievo di sangue, il siero deve essere separato dal coagulo il più rapidamente possibile per evitare l'emolisi. I campioni devono essere mantenuti refrigerati o congelati fino al test. Evitare il ripetuto congelamento e scongelamento dei campioni e la contaminazione microbica. L'uso di campioni inattivati dal calore, lipemici, emolitici, itterici o torbidi può dare 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

Prima dell'uso, portare tutti i reagenti e le strisce da microtitolazione a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Le strisce da microtitolazione devono essere rimosse dalla busta di alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente.

Mescolare bene i reagenti immediatamente prima dell'uso. Dopo l'uso, riportare rapidamente il kit a 2 - 8 °C.

Prelevare solo il numero di reagenti necessari per eseguire il test. Non tornare a versare il reagente in eccesso nel contenitore perché questo può causare contaminazione.

Le strisce da microtitolazione non devono essere utilizzate più di una volta. Non utilizzare reagenti o strisce da microtitolazione se la confezione è danneggiata o i contenitori non sono sigillati ermeticamente.

Alcuni dei reagenti nel kit non sono specifici di questo test. I reagenti identificati con Sero (come SeroPP) possono essere utilizzati anche per altri test ELISA RIDASCREEN® Sero con gli opportuni reagenti.

I sieri di controllo sono specifici per ogni lotto. Non è consentito scambiare i sieri di controllo tra kit con numeri di lotto diversi.

I controlli di qualità A e B del test ELISA RIDASCREEN® Sero sono offerti come campioni di controllo aggiuntivi specifici nel kit del test ELISA RIDASCREEN® Sero corrispondente. Si tratta di campioni di controllo da utilizzare facoltativamente per un'ulteriore garanzia della qualità. Contengono siero umano di controllo con diverse concentrazioni di anticorpi.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio SeroWP con 9 parti di acqua distillata. A questo scopo, aggiungere 100 ml di concentrato in un cilindro da 1000 ml e riempire con acqua distillata fino a 1000 ml. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere prima sciolti attraverso il riscaldamento (bagnomaria a 37 °C). Il tampone di lavaggio diluito ha una durata massima di quattro settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e di cinque giorni se conservato a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).

9.3. Preparazione dei campioni

Prima di iniziare il test, diluire i campioni di siero con il tampone di diluizione SeroPP. Le diluizioni sono diverse per IgG e IgM.

IgG: diluizione dei campioni di siero 1:200

Per esempio: 10 µl di siero + 1990 µl di

IgM: diluizione dei campioni di siero 1:100

Per esempio: 10 µl di siero + 990 µl di

Per le determinazioni degli anticorpi IgM, si raccomanda di effettuare un assorbimento delle IgG sieriche (per esempio con RIDA® RF-Absorbens, Art. n. Z0202) prima del test.

Attenzione!

I controlli negativo, standard e di qualità A e B sono pronti all'uso e non devono essere diluiti o assorbiti.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver collocato un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, pipettare 100 µl ciascuno dei sieri diluiti e dei controlli pronti all'uso nei rispettivi pozzetti; la posizione A1 (valore bianco del substrato) rimane vuota. Aggiungere il controllo negativo o una volta, e il controllo positivo o in duplicato.

Aggiungere i controlli di qualità e o i controlli di qualità e una volta. La piastra sarà posta in un incubatore per 30 minuti a 37 °C. La base dei pozzetti non deve rimanere a contatto con materiali che conducono facilmente calore. Coprire la piastra da microtitolazione durante l'incubazione.

Usare i controlli appropriati (IgG o IgM).

A1	Valore bianco del reagente
B1	Controllo negativo
C1	Controllo standard
D1	Controllo standard
E1	Controllo di qualità A
F1	Controllo di qualità B
G1	Siero di paziente diluito

Attenzione!

Non collocare la piastra da microtitolazione in un contenitore di incubazione freddo da portare successivamente a 37 °C durante l'incubazione. Il contenitore deve essere preventivamente portato a 37 °C.

9.5. Lavaggio

Svuotare i pozzetti in un contenitore per rifiuti contenente una soluzione di ipoclorito per la disinfezione. Quindi picchiettare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità residua. Lavare poi la piastra 4 volte utilizzando ogni volta 300 µl di tampone di lavaggio. Dopo ogni lavaggio, picchiettare la piastra su un pezzo di carta inutilizzato per garantire lo svuotamento completo.

Quando si utilizza un dispositivo di lavaggio, assicurarsi che sia impostato correttamente per il tipo di piastra. Dopo il lavaggio, picchiettare la piastra su carta assorbente e pulita per rimuovere l'umidità residua.

9.6. Seconda incubazione

Aggiungere 100 µl di coniugato anti-IgG umane LD **SeroG LD** o di coniugato anti-IgM umane LD **SeroM LD** ai pozzetti corrispondenti (compreso A1).

Successivamente porre la piastra in un incubatore per 30 minuti a 37 °C (vedere punto 9.4.).

9.7. Lavaggio

Lavare quattro volte come descritto al punto 9.5.

9.8. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **SeroSC** a ogni pozzetto. Quindi porre la piastra in un incubatore per 30 minuti a 37°C. Successivamente aggiungere 100 µl di reagente bloccante **Stop** a ciascun pozzetto per fermare la reazione. Dopo aver miscelato accuratamente la piastra (picchiettando con delicatezza sul bordo della piastra), l'estinzione verrà misurata in un fotometro per piastre a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento ≥ 620 nm). Eseguire la misurazione entro 20 minuti dall'arresto. Il valore del bianco viene regolato sul valore del bianco del reagente (posizione A1).

10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità, il controllo standard (in duplicato) e il controllo negativo devono essere eseguiti ad ogni test. Il test si considera eseguito correttamente quando la media di estinzione del controllo standard a 450/620 nm rientra nell'intervallo indicato sul certificato di qualità allegato per il lotto specifico. Se le due singole misurazioni si discostano di oltre il 20% dalla media, il test deve essere ripetuto. Il controllo negativo deve avere un valore di estinzione di $< 0,3$ a 450/620 nm.

I controlli di qualità A e B del test ELISA RIDASCREEN® Sero sono campioni di controllo aggiuntivi per la garanzia di qualità che possono essere utilizzati facoltativamente. L'intervallo target è indicato nel certificato di qualità specifico del lotto. I singoli valori (U/ml, IU/ml o mIU/ml) sono valori di riferimento per l'operatore per la garanzia di qualità interna del laboratorio.

Una deviazione dai valori attesi, nonché torbidità o colorazione blu del substrato prima dell'aggiunta ai pozzetti possono indicare che il reagente è scaduto.

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

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Prestazioni funzionali dell'attrezzatura utilizzata (ad es. calibrazione)
- Correttezza della procedura di esecuzione del test
- Controllo visivo dei componenti del kit, che non devono mostrare contaminazione o perdite; se la soluzione del substrato è diventata blu non deve più essere utilizzata.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, contattare il produttore.

11. Valutazione e interpretazione

I test possono essere valutati in tre modi diversi:

1. Con la curva standard fornita
2. Con la tabella dei valori (vedere la scheda tecnica in accompagnamento)
3. Matematicamente, mediante il metodo a 4 parametri o il metodo α

Il valore del bianco del reagente deve essere sottratto da tutti i valori di estinzione prima della valutazione.

11.1. Valutazione mediante curva standard

Per una valutazione mediante curva standard, la fluttuazione giornaliera deve essere corretta prendendo la media del controllo standard. Il fattore di correzione F viene calcolato utilizzando il valore target per il controllo standard e il valore attualmente misurato del controllo. Prendere nota del valore target legato al lotto sul certificato di qualità associato.

$$F = \frac{\text{Valore target per il controllo standard}}{\text{Media di estinzione per il controllo standard}}$$

Moltiplicare tutti i valori di OD del campione per il fattore F. Il valore U/ml corrispondente viene letto sulla curva standard utilizzando questi valori corretti.

11.2. Valutazione mediante tabella dei valori

Nella tabella dei valori, la media di estinzione per il controllo standard determina la colonna con l'intervallo di valori applicabile alla misurazione corrente. All'interno di questa colonna, il valore di estinzione del campione misurato è associato all'intervallo di estinzione appropriato, e il titolo corrispondente in U/ml viene letto nella seconda colonna da sinistra.

Per esempio, si consideri una media di estinzione per il controllo standard pari a 0,91 in una misurazione. In questo caso, per determinare il risultato viene utilizzata la colonna con l'intervallo da 0,89 a 0,94 nella tabella. Un campione di paziente con un valore di estinzione pari a 0,61 si trova in un intervallo del titolo compreso tra 2,01 e 35,0 U/ml. (I valori di cui sopra sono esempi e possono scostarsi dai valori correnti nella scheda tecnica).

La valutazione del risultato determinato - positivo (+), negativo (-) o borderline (?) - si trova nella prima colonna della tabella dei valori.

	U/ml	Intervalli di valori per il controllo standard			
				0,89 - 0,94	
-	< 16,0			< 0,49	
?	16,0 - 20,0			0,49 - 0,56	
+	20,1 - 35,0			0,57 - 0,85	
	35,1 - 60,0			0,86 - 1,20	
	60,1 - 100,0			1,21 - 1,55	
	100,1 - 150,0			1,56 - 1,81	
	150,1 - 400,0			1,82 - 2,39	
	> 400,0			> 2,39	

Fig. 1: Esempio di determinazione di IgG (estratto da una scheda tecnica specifica per un lotto)

11.3. Valutazione matematica

I valori richiesti per una valutazione matematica con metodo a 4 parametri o con metodo α sono indicati nella scheda tecnica di accompagnamento.

11.4. Valutazione e interpretazione

Tab. 3: Valutazione delle unità determinate

	Negativo	Borderline	Positivo
IgG	< 16	16 - 20	> 20
IgM	< 16	16 - 20	> 20

12. Limiti del metodo

RIDASCREEN® Hantavirus Puumala rileva anticorpi IgG o IgM diretti contro l'hantavirus Puumala. Il test è indicato solo nei casi di sospetta infezione da hantavirus. I risultati del test devono essere sempre interpretati in combinazione con il quadro clinico e altri riscontri diagnostici. Lo sviluppo di anticorpi può variare da paziente a paziente in termini di tempo e concentrazione. Un risultato negativo non esclude un'infezione da hantavirus, poiché l'infezione può essere in fase iniziale o la sottospecie può essere diversa. Se rimane un sospetto clinico il test deve essere ripetuto dopo qualche giorno. Si raccomanda, a seconda dell'origine geografica del paziente, di testare contemporaneamente un'infezione con un diverso ceppo di hantavirus, ad esempio Dobrava/Hantaan. Un risultato positivo non esclude la presenza di altri patogeni infettivi.

13. Prestazioni e caratteristiche

Tab. 5: Varianza inter-analisi (n = 30)

Varianza inter-analisi	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Siero 1	81,71	13,6%	75,84	13,1%
Siero 2	43,03	25,9%	49,04	12,8%
Siero 3	64,43	17,7%	101,67	19,5%
Siero 4	5,87	non disponibile	1,52	non disponibile

Tab. 6: Varianza intra-analisi (n = 23)

Varianza intra-analisi	IgG		IgM	
	U/ml	CV	U/ml	CV
Siero 1	98,57	11,6%	74,64	5,2%
Siero 2	25,30	6,8%	42,62	10,3%
Siero 3	34,68	6,5%	75,87	13,6%
Siero 4	4,48	non disponibile	1,35	non disponibile

Tab. 7, 8: Prestazioni cliniche rispetto ad altri test ELISA disponibili in commercio

IgG		Competitor			
		Positivo	Borderline	Negativo	Totale
R-Biopharm	Positivo	10	3	0	13
	Borderline	2	1	0	3
	Negativo	8*	15	43	66
	Totale	20	19	43	82

Concordanza positiva: 55,6*%

Concordanza negativa: 100%

*La discrepanza tra i risultati (competitor positivo e R-Biopharm negativo) è stata verificata utilizzando un test di riferimento (LineBlot) che ha portato a riscontri negativi.

IgM		Competitor			
		Positivo	Borderline	Negativo	Totale
R-Biopharm	Positivo	10	2	6	18
	Borderline	0	1	6	7
	Negativo	0	3	54	57
	Totale	10	6	66	82

Concordanza positiva: 100%

Concordanza negativa: 90%

Tab. 9: Risultati di 200 donatori di sangue provenienti da una banca del sangue in Germania

200 sieri di donatori di sangue	IgG	IgM
Negativo	99,0%	96,5%
Borderline	0,5%	1,0%
Positivo	0,5%	2,5%

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e nome
2018-02-01	Versione di rilascio

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Attenersi alle istruzioni per l'uso
	Codice identificativo
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici del test

Plate	Piastra da microtitolazione
SeroPP	Tampone di diluizione
SeroWP	Tampone di lavaggio 10x
Control IgG +	IgG controllo standard
Control IgM +	IgM controllo standard
Control IgG -	IgG controllo negativo
Control IgM -	IgM controllo negativo
Control IgG A	IgG controllo di qualità A
Control IgM A	IgM controllo di qualità A
Control IgG B	IgG controllo di qualità B
Control IgM B	IgM controllo di qualità B
SeroG LD	Coniugato anti-IgG umane
SeroM LD	Coniugato anti-IgM umane
SeroSC	Substrato TMB
Stop	Reagente bloccante

16. Bibliografia

1. *Ulrich R, Meisel H, Schütt M, Schmidt J, Kunz A, Klempa B, u. a.* Verbreitung von Hantavirusinfektionen in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz [Internet]. Juli 2004 [zitiert 23. Mai 2017];47(7). Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s00103-004-0858-8>
2. *Hahn H, Kaufmann SH, Schulz TF, Suerbaum S, Adler K, Schad D, u. a.* Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag; 2009.
3. *Jonsson CB, Figueiredo LTM, Vapalahti O.* A global perspective on hantavirus ecology, epi-demiology, and disease. Clin Microbiol Rev. 2010;23(2):412–41.
4. *Peters MD, Simpson MD, Levy MD.* Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Annu Rev Med. 1999;50(1):531–45.
5. *Martens H.* Serologische Untersuchungen zur Prävalenz und zum Verlauf von Hantavirus-Infektionen in Mecklenburg-Vorpommern. Gesundheitswesen. 2000;62(02):71–7.