

LEISHMANIA IgG/IgM CARD

Per uso diagnostico *in Vitro*

Test Immunocromatografico su card per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG/IgM contro *Leishmania* in siero, plasma e sangue intero

I. DESTINAZIONE D'USO

Leishmania IgG/IgM Card è un test immunocromatografico a flusso laterale per la determinazione simultanea e la differenziazione degli anticorpi IgG e IgM specifici nel genere contro la *Leishmania donovani* (*L. donovani*), protozoo che causa la Leishmaniosi viscerale, in campioni di siero, plasma umano o sangue intero. Serve per lo screening e come aiuto nella diagnosi dell'infezione Leishmaniosi viscerale. Ogni risultato positivo deve essere confermato da metodi alternativi.

II. SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La Leishmaniosi viscerale o Kala-azar, è un'infezione diffusa causata da numerose sottospecie di *L. donovani*. La malattia è stimata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in circa 12 milioni di persone in 88 paesi¹. E' trasmessa all'uomo dalle punture dei flebotomi, che acquisiscono l'infezione nutrendosi di animali infetti. Anche se è una malattia dei paesi poveri, nel Sud Europa è diventata l'infezione opportunistica leader in pazienti affetti da AIDS²⁻³.

L'identificazione dell'organismo *L. donovani* nel sangue, midollo osseo, fegato, linfonodi o nella milza fornisce un mezzo definitivo di diagnosi. La determinazione sierologica di anti-*L. donovani* IgM è un eccellente marcatore per la leishmaniosi viscerale acuta. I test utilizzati includono ELISA, immunofluorescenza o test di agglutinazione diretta⁴⁻⁵. Recentemente, l'utilizzo di proteine specifiche *L. donovani* nel test ha migliorato notevolmente la sensibilità e la specificità⁶⁻⁷.

Il Leishmania IgG/IgM Card è un test sierologico che utilizza proteine ricombinanti e che rileva contemporaneamente gli anticorpi IgG e IgM anti *L. donovani*. Il test fornisce un risultato affidabile in 15 minuti senza l'utilizzo di strumenti.

III. PRINCIPIO DEL TEST

Leishmania IgG/IgM Card è un test immunocromatografico a flusso laterale. La strip all'interno della cassetta è composta da: 1) un pad colorato contenente antigeni ricombinanti di *L. donovani* coniugati con oro colloidale (coniugato Leishmania) e IgG di topo coniugate con oro colloidale, 2) una membrana di nitrocellulosa contenente due bande test (T1 e T2) e una banda di controllo (C). La banda T1 è adsorbita con anticorpo monoclonale anti-IgM umane per la determinazione di IgM anti- *L. donovani*, la banda T2 è adsorbita con reagenti per la determinazione di IgG anti- *L. donovani*, e la banda C band è adsorbita con IgG di capra anti-coniglio.

Quando viene dispensato un volume adeguato di campione nel pozzetto S, il campione migra per capillarità lungo la membrana. Se nel campione sono presenti anticorpi IgM contro *L. donovani*, essi si legheranno al coniugato Leishmania. L'immunocomplesso formato viene catturato sulla membrana dall'anticorpo IgM precedentemente adsorbito, formando una banda colorata a livello della T1, indicando un risultato positivo per le IgM.

Se sono presenti anticorpi IgG contro *L. donovani*, essi si legheranno al coniugato Leishmania. L'immunocomplesso viene catturato sulla membrana dai reagenti precedentemente adsorbiti, formando una banda colorata a livello della T2, indicando un risultato positivo per le IgG.

L'assenza delle bande T1 e T2 indica un risultato negativo. Il test contiene un controllo interno (banda C) che si colora per l'accoppiamento dell'immunocomplesso di IgG anti-coniglio di capra / IgG di oro coniugato indipendentemente dalla formazione delle bande test. Altrimenti il test non è valido e deve essere ripetuto.

IV. REAGENTI E MATERIALI FORNITI

- Il kit da 10 test contiene delle buste sigillate con:
 - una card (cassetta)
 - una bustina di essiccante.
- Pipette di plastica (10 pezzi)
- Diluente del campione (1 flacone da 1.0 ml)
- Istruzioni per l'uso

V. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Contenitori per la raccolta del campione
- Cronometro
- Centrifuga
- Pungidito e tubi capillari eparinizzati, solo per la puntura del dito

VI. PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro* e solo per uso professionale.
2. Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di effettuare il test. Un uso improprio potrebbe dare luogo a risultati errati.
3. Aprire la busta della card appena prima lo svolgimento del test
4. Non usare oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione.
5. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (15-30°C) prima dell'uso.
6. Non usare reagenti provenienti da kit diversi.
7. Non usare campioni di sangue emolizzato per il test.
8. Indossare indumenti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso. Lavarsi bene le mani dopo aver effettuato il test.
9. Non mangiare, bere o fumare durante l'analisi.
10. Manipolare tutti i campioni come fossero infettivi. Smaltire i campioni e i componenti del kit seguendo le buone regole del laboratorio.
11. Il risultato del test deve essere letto entro 15 minuti dalla deposizione del campione. Non leggere oltre 30 minuti. Potrebbero essere dei risultati errati.
12. Non effettuare il test in stanze con forti correnti d'aria, per esempio vicino ad un ventilatore o all'aria condizionata.



VII. PREPARAZIONE DEI REAGENTI E ISTRUZIONI DI CONSERVAZIONE

Tutti i reagenti forniti sono pronti all'uso. Conservare i dispositivi test non ancora aperti a 2°C-30°C. Se conservati a 2°C-8°C, assicurarsi che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima di essere aperti. Il dispositivo test è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla busta. Non congelare o esporre a temperature superiori a 30°C.

VIII. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Il test Leishmania IgG/IgM Card può essere utilizzato con campioni di sangue intero (proveniente da puntura del dito o da prelievo venoso), di siero o di plasma.

Considerare il materiale di origine umana come potenzialmente infettivo e manipolare secondo le procedure standard di biosicurezza.

Sangue intero da puntura del dito e prelievo venoso

Lavare la mano del paziente, quindi lasciare asciugare. Massaggia la mano senza toccare il punto dove verrà fatta la puntura. Forare la pelle con una lancetta sterile. Pulire il primo segno di sangue. Strofinare delicatamente la mano dal polso al palmo fino al dito per formare una goccia arrotondata di sangue sul sito di puntura. Aggiungere il campione di sangue intero al dispositivo per il test usando un tubo capillare o facendo cadere la goccia di sangue nel pozzetto.

Non usare sangue emolizzato. I campioni di sangue intero devono essere conservati a +2 - +8°C se non testati immediatamente. Tali campioni devono essere testati entro 24 ore dal prelievo.

Plasma

1. Raccogliere i campioni di sangue in provette con tappo viola, blu o verde (contenenti rispettivamente EDTA, citrato o eparina in Vacutainer®) attraverso puntura venosa.
2. Separare il plasma per centrifugazione.
3. Trasferire il plasma in un'altra provetta contrassegnata.

Siero

1. Raccogliere i campioni di sangue in una provetta con tappo rosso (senza anticoagulanti in Vacutainer®) attraverso puntura venosa.
2. Attendere che il sangue coaguli.
3. Separare il siero per centrifugazione.
4. Trasferire il siero in un'altra provetta contrassegnata.

Testare i campioni il prima possibile. Conservare i campioni a +2°C - +8°C se non testati immediatamente per un massimo di 5 giorni. Per un periodo più prolungato conservarli congelati a -20°C. Evitare continui congelamenti e scongelamenti.

Prima di effettuare il test, scongelare e portare a temperatura ambiente lentamente i campioni, agitandoli delicatamente. I campioni che contengono materiale corpuscolare devono essere centrifugati. Non usare campioni torbidi, emolizzati o lipemici; potrebbero dare interferenze sul risultato.

IX. PROCEDIMENTO

Step 1: Lasciare che i campioni e i reagenti refrigerati raggiungano temperatura ambiente. Miscelare bene i campioni prima di usarli.

Step 2: *Aprire la busta ed estrarre la card. Metterla su una superficie piana e pulita.*

Step 3: Identificare la card con il numero del campione.

Step 4: Per sangue intero, Siero o Plasma

Tenere il contagocce in verticale e trasferire **2 gocce di campione** (circa 80 µL) nel pozzetto (S) del dispositivo, quindi aggiungere **1 goccia di diluente del campione** (circa 40 µL) per siero o plasma e **2 gocce di diluente del campione** (circa 80 µL) per sangue intero.

Per sangue intero da puntura del dito

Uso del tubo capillare: riempire il capillare e trasferire **circa 50 µL (o 2 gocce) di sangue proveniente dalla puntura del dito** nel pozzetto (S) del dispositivo, quindi aggiungere **2 gocce di diluente del campione** (circa 80 µL) immediatamente.

Step 5: Far partire il cronometro.

Step 6: Il risultato è leggibile entro 15 minuti. I risultati positivi potrebbero essere visibili anche entro 1 minuto.

Non leggere oltre i 30 minuti. Per evitare confusione gettare i test subito dopo la loro interpretazione.

X. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. **NEGATIVO:** formazione della sola banda di controllo. Nel campione non c'è una quantità sufficiente di anticorpi IgM e IgG anti- *L. donovani*. Il risultato è negativo.



2. **POSITIVO:** formazione di due bande: C e T1. Nel campione è presente una quantità di anticorpi IgM anti- *L. donovani* rilevabile. Il risultato è positivo.



formazione di due bande: C e T2. Nel campione è presente una quantità di anticorpi IgG anti- *L. donovani* rilevabile. Il risultato è positivo.

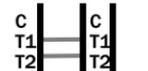


formazione di tre bande: C, T1 e T2. Nel campione ci sono quantità rilevabili di anticorpi IgM e IgG anti- *L. donovani*. Il risultato è positivo.



**Nota: l'intensità del colore delle bande test (T1 e/o T2) varierà a seconda della concentrazione di anticorpi Leishmania nel campione. Pertanto, qualsiasi sfumatura di colore nelle aree della linea di test (T1 e/o T2) deve essere considerata positiva. I campioni con risultati positivi devono essere confermati con metodi di analisi alternativi e risultati clinici prima di effettuare una determinazione positiva.*

3. NON VALIDO: se non compare la banda di controllo (C) il test non è valido, indipendentemente dalla presenza delle bande test (T1 o T2), come illustrato di seguito. Ripetere il test con una nuova card.



XI. CARATTERISTICHE FUNZIONALI

Dati clinici

Sono stati confrontati 234 campioni di soggetti sensibili, utilizzando il test Leishmania IgG/IgM Card e un test EIA in commercio. I risultati sono raccolti nella seguente tabella:

EIA	Leishmania IgG/IgM Card MB		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	31	3	34
Negativo	1	199	200
Totale	32	202	234

Sensibilità relativa: 91.2% , Specificità relativa: 99.5%, Accuratezza 98.3%

XII. LIMITI

- Devono essere seguite attentamente tutte le istruzioni per il procedimento del test e l'interpretazione dei risultati. In caso contrario si potrebbero generare risultati non accurati.
- Il test Leishmania IgG/IgM Card permette la determinazione qualitativa delle IgM e IgG anti- *L. donovani* in siero umano, in plasma o in sangue intero. L'intensità della banda test non indica una correlazione lineare con la concentrazione degli anticorpi nel campione.
- Un risultato negativo indica assenza di quantità rilevabili di anticorpi IgM o IgG anti- *L. donovani* nel campione. Tuttavia, un risultato negativo non preclude la possibilità di esposizione all'infezione con *L. donovani*.
- Si può avere un risultato negativo se la quantità di IgM o IgG anti- *L. donovani* presente nel campione è inferiore al limite di rilevabilità del test, o se gli anticorpi che vengono rilevati non sono presenti al momento del prelievo in una determinata fase della malattia.
- Alcuni campioni contenenti non frequenti titoli molto alti di anticorpi eterofili o fattore reumatoide, potrebbero influenzare i risultati del test.
- I risultati ottenuti con questo test dovrebbero essere interpretati solo insieme ad altri test diagnostici e supportati da dati clinici.

XIII. BIBLIOGRAFIA

- WHO. Control of the Leishmaniasis. World Health Organization. Technical Report Series 1990. No. 793.
- Rosenthal E, Marty P. Visceral leishmaniasis. Rev Prat. 2004;54(20):2211-6.
- Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of Leishmania. Ann Trop Med Parasitol. 2003 ;97 Suppl 1:29-45.
- Allain DS, Kagan IG. A direct agglutination test for leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1975 ;24(2):232-6.
- Badaro R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological Am J Trop Med Hyg. 1983;32(3):480-4.
- Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Ben Salah A, et, al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2003 68(3):312-20.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15;90(2):775-9.

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Limiti di temperatura		Codice del lotto (EXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto		Non sterile
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)		Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CONTENUTO

Leishmania Card	Cod. VQ85200 (10 test)
Diluyente del campione	10 pezzi
Istruzioni per l'uso	1 x 1,0 mL
	1 pezzo