

USO

Il test rapido NADAL® CCA (Antigene catodico circolante) Bilharzia a cassetta, per la determinazione presuntiva e qualitativa di un'infezione attiva di Schistosoma, in particolare *Schistosoma mansoni*, ma anche altre specie, per esempio *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*.

I livelli di schistosomiasi urinaria sono variabili, ed inoltre sembrano essere differenti per regioni. In generale, infezioni di livello medio-alto di *Schistosoma haematobium* possono essere diagnosticate usando la striscia per l'urina CCA. Questo test dovrebbe essere usato per pazienti che mostrano segni e sintomi compatibili con un'infezione di Bilharzia. Per studi endemici, un singolo test CCA dell'urina dimostra da vicino la reale prevalenza, prevista dai modelli basati su determinazioni multiple di conteggio a base di uova.

SIGNIFICATO CLINICO, INTRODUZIONE E DIAGNOSI DI BILHARZIA

1) SIGNIFICATO CLINICO:

Il test a cassetta CCA per l'urina è un metodo facile e veloce per la determinazione presuntiva di Bilharzia in persone con segni clinici e sintomi coerenti con un'infezione attiva di Bilharzia. Un risultato del test positivo indica un'infezione attiva di schistosoma. Risultati positivi sono presuntivi e devono prendere in considerazione regimi diagnostici come la storia clinica del paziente, scoperte cliniche, diagnosi tramite microscopio sull'urina o feci, test sierologici, biopsie ed altre analisi istologiche dei tessuti. Il test potrebbe essere un falso negativo in caso di basso livello di infezione parassitaria. Il risultato del test deve essere interpretato cautamente durante le fasi premature di sviluppo dell'infezione Schistosoma, normalmente nelle prime 4-8 settimane dopo l'infezione che può dare un risultato falso negativo. Il possesso di anticorpi contro lo Schistosoma può ulteriormente confermare il sospetto clinico. Gli anticorpi contro lo Schistosoma, tuttavia, possono permanere per molti anni, anche dopo trattamenti efficaci, rendendo la diagnosi di una nuova infezione o di cure inefficaci molto verosimile. Gli anticorpi possono anche essere assenti in alcuni casi di infezione attiva cronica. Secondo certe ricerche, il successo dopo un trattamento standard di chemioterapia è compreso tra 65-85%. Il CCA diminuisce rapidamente dopo aver svolto un trattamento efficace ed un test positivo normalmente diventa negativo entro 2-3 settimane dal trattamento. Nuove infezioni possono manifestarsi in un risultato positivo del test entro 6-10 settimane dall' inizio di un'efficace trattamento chemioterapico.

2) INTRODUZIONE:

Gli schistosomi sono distomatosi presenti nel sangue, che appartengono alla classe dei Trematodi, ma che si differenziano dagli altri trematodi, perché hanno parassiti adulti diversi per genere. La riproduzione sessuata avviene nell'ospite finale (esseri umani, bovini, etc.) a seconda della specie di schistosoma, mentre la fase di riproduzione a sessuata avviene nel serpente (ospite intermedio). La cercaria (sostanza rilasciata nell'acqua da particolari tipi di serpenti) entra il corpo umano tramite la pelle. Lo schistosoma giovane è il più soggetto a danni mediati dal sistema immunitario. Utilizzando certi meccanismi di evasione, il verme diventa refrattario o anche immunologicamente irrisconoscibile per certe parti del sistema immunitario dell'ospite, anche per un periodo di tempo fino a 40 anni. Approssimativamente dopo 6 settimane dopo l'infezione, la coppia di vermi adulta inizia a deporre uova che penetrano nella barriera intestinale (*S. mansoni*, *S. japonicum*) o la vescica (*S. haematobium*). Una parte consistente di uova non viene secreta ma trattenuta nel tessuto, inducendo la formazione di un granuloma con conseguenti complicazioni per i diversi organi colpiti. Il condotto gastrointestinale dello schistosoma è un vicolo cieco. Il parassita deve rigurgitare ad intervalli regolari i paracoliti non digeriti, così come le "glicoproteine parassiti che dello stomaco associate". Uno dei maggiori antigeni rigurgitati dai parassiti è il CCA (antigene catodico circolante). Anche se anche le uova di schistosoma rilasciano l'antigene CCA, ciò avviene in piccole quantità. La maggior quantità di CCA ha origine dai vermi adulti vivi.

3) DIAGNOSI DELLO SCHISTOSOMA:

La diagnosi dello schistosoma in laboratorio è normalmente effettuata tramite l'individuazione al microscopio di uova nell'urina o con metodi immunologici (individuazione di anticorpi o antigeni). La diagnosi al microscopio è lo standard di riferimento per individuare e confermare qualsiasi infezione attiva di schistosoma. Tuttavia, la diagnosi di esperti al microscopio spesso non è disponibile o può ritardare il trattamento terapeutico in pazienti clinicamente sospetti, oppure può essere inaffidabile o assente in aree remote. La sensibilità degli esami al microscopio, inoltre, dipende dalla serietà dell'infezione. Nelle infezioni di basso livello, la sensibilità dell'esame al microscopio può essere bassa fino al 20%. Nei casi clinicamente sospetti è consigliato esaminare fino a 5 campioni di urina (raccolti dopo mezzogiorno) e/o 5 campioni di feci per aumentare la sensibilità dei test. A seconda della modulazione del sistema immunitario dell'ospite, l'ospite infetto può mostrare una risposta di anticorpi di IgG, IgM, IgA e IgE separati, oppure una combinazione di questi isotopi. Circa il 14% dei pazienti non reagisce con la formazione di anticorpi. A seconda della metodologia utilizzata e il tempismo nell'ospite infetto, la sensibilità dell'analisi degli anticorpi presenti non è ottimale (variando tra il 65 e l'86%). Alcune delle metodologie comunemente usate sono basate sul possesso di anticorpi diretti contro l' antigene solubile delle uova (SEA). A causa della ritenzione delle uova e della secrezione

costante di SEA dalle uova depositate, gli anticorpi possono essere dedotti per un periodo indefinito dopo l'infezione primaria, non tenendo conto di un trattamento efficace. Il test a cassetta CCA per l'urina è un test di individuazione dell'antigene, che è presente in tutte le specie di schistosoma, incluse specie animali. La maggior porzione di CCA rilasciato da parassiti vivi adulti è secreto nelle urine. Un risultato positivo nel test CCA su un campione di urina collezionato casualmente nel mezzo del flusso indica un'infezione attiva di schistosoma.

PRINCIPIO DEL TEST

Dopo aver raccolto l'urina, l'antigene CCA potenzialmente presente nel campione si lega all'anticorpo monoclonale immobilizzato nella membrana del campione. La soluzione, poi, scorre sulla striscia dove il complesso antigene-anticorpo si attacca ad un altro anticorpo monoclonale immobilizzato sulla linea del test. Si sviluppa una linea rosa. La seconda linea è un controllo procedurale, che deve sempre apparire, per assicurare che il test funzioni in modo corretto. L'intensità della linea è qualitativamente collegata all'intensità dell'infezione.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Ogni kit contiene le seguenti componenti in quantità sufficienti per svolgere il numero di test indicati sull'etichetta.

- 25 test a cassetta impacchettati individualmente
- 1 manuale di istruzioni
- 1 bottiglia di soluzione tampone (3 mL)
- 25 strumenti per la raccolta di urina (pipette di plastica)

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Orologio o timer
2. Contenitore per l'urina

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Mantenere le scatole di conservazione asciutte
2. Non riutilizzare i test a cassetta
3. Non utilizzare i test a cassetta se il foglio è bucato o danneggiato
4. Mai pipettare con la bocca o lasciare che i reagenti o il campione del paziente venga in contatto con la pelle
5. Risultati ottimali possono essere ottenuti seguendo attentamente questo protocollo. I reagenti devono essere aggiunti attentamente, mantenendo precisione ed accuratezza.
6. Eseguire l'analisi al di fuori dei tempi e delle temperature prescritte può condurre risultati invalidi. Le analisi che non rientrano nei tempi e temperature prestabilite devono essere ripetuti.
7. I componenti in questo kit sono stati testati in un controllo di qualità come un lotto di unità specializzate. Non mescolare componenti provenienti da numeri di lotto differenti. Non mescolare con componenti di altri produttori.
8. Prestare attenzione nel proteggere i reagenti in questo kit da contaminazione. Non utilizzare se presentano segni di contaminazione o precipitazione microbica. La contaminazione biologica di strumenti di dispensatori, contenitori o reagenti può condurre a falsi risultati.
9. Non "disattivare" i campioni tramite calore
10. Tutta l'urina umana deve essere maneggiata come materiale potenzialmente infetto
11. Smaltimento rifiuti: I materiali di analisi devono essere smaltiti secondo le normative locali, nazionali e/o federali.

CAMPIONATURA E PREPARAZIONE

Un campione casuale di urina raccolto durante il flusso urinario.

CONSERVAZIONE

CONSERVAZIONE E DURATA DEI REAGENTI

1. Conservare il kit tra i 2 e i 30° C. La temperatura di conservazione dev'essere mantenuta costante in modo da mantenere utilizzabili i reagenti fino alla data di scadenza del kit. Fare riferimento alla confezione per la data di scadenza.
2. Non congelare i componenti del kit
3. Il kit del test può essere utilizzato fino alla data di scadenza stampata sulla confezione.
4. Non utilizzare i componenti oltre la data di scadenza.

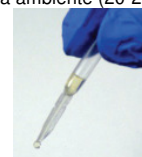
CONDERSVAZIONE E DURATA DEI CAMPIONI DI URINA

1. I campioni di urina dei pazienti possono essere conservati a 4° C per almeno 7 giorni
2. I campioni di urina dei pazienti possono essere conservati a -20° C per almeno 1 anno solare.

PROCEDURA DI ANALISI

Note: Assicurarsi che tutti i reagenti siano a temperatura ambiente (20-25° C) prima di cominciare il test.

1. Rimuovere la cassetta del test e gli strumenti di raccolta dalla loro confezione appena prima dell'uso.
2. Premere il bulbo della pipetta ed inserire la punta nel campione di urina. Riempire la pipetta rilasciando delicatamente il bulbo.



- Trasferire una goccia di urina nel buco circolare della cassetta del test premendo lievemente il bulbo. Lasciare che il campione venga assorbito dal buco circolare sulla cassetta.
- Posizionare la bottiglia di tampone verticalmente, a circa 1 cm dal buco circolare sulla cassetta. Aggiungere una goccia di tampone.
- Leggere i risultati esattamente 20 minuti dopo aver aggiunto il tampone. Qualsiasi risultato letto dopo 25 minuti dev'essere considerato invalido e dev'essere ripetuto. La linea di controllo blu deve diventare rosa, se rimane blu il test dev'essere considerato invalido. Qualsiasi linea nell'area del test dev'essere considerata positiva.



In modelli sperimentali su animali (babbuini) è stato determinato che il CCA può essere rilevato in infezioni con circa 50 vermi e più. Il limite di rilevazione dalla striscia CCA per l'urina è paragonabile al limite di rilevazione tramite conteggio di uova.

Differenziazione di Specie di Schistosoma

Le concentrazioni più elevate di CCA sono state rilevate nelle infezioni da *S. mansoni* e perciò il test è particolarmente utile per diagnosticare lo schistosoma mansoni intestinale. I livelli di schistosoma nell'urina sono variabili e sembrano cambiare tra le regioni. In generale livelli medio-alti di infezione di *S. haematobium* possono essere diagnosticati usando la striscia per l'urina CCA.

Reattività incrociata

Infezioni del tratto urinario o ematuria possono talvolta dare risultati falsi positive.

DICHIARAZIONE DI NON RESPONSABILITÀ

L'intero rischio riguardo all'esecuzione del test ed all'utilizzo dei prodotti è a carico dell'acquirente. La diagnostica medica rapida non dovrebbe essere responsabile per danni indiretti, speciali o conseguenti ad ogni risultato derivante dall'utilizzo di questi prodotti.

BIBLIOGRAFIA

- References to published papers on the use of CCA urine strips.
- Ayele B, Erko B, Legesse M, Hailu A and Medhin G, 2008. Evaluation of circulating cathodic antigen (CCA) strip for diagnosis of urinary schistosomiasis in Hassoba school children, Afar, Ethiopia. Parasite 15, 69-75.
 - Legesse M and Erko B, 2007. Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of Schistosoma mansoni by detecting circulating cathodic antigen in urine before and after chemotherapy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 101, 668-673.
 - Stothard JR, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Kazibwe F, Rollinson D, Mathieson W, Webster J.P. and Fenwick A, 2006. Use of circulating cathodic antigen (CCA) dipsticks for detection of intestinal and urinary schistosomiasis. Acta Trop. 97, 219-228.
 - van Dam GJ, Wichers JH, Ferreira TM, Ghati D, van AA and Deelder AM, 2004. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. J. Clin. Microbiol. 42, 5458-5461.
 - Van Etten L, Follan CC, Eggelte TA, Kreamsner PG and Deelder AM, 1994. Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. J. Clin. Microbiol. 32, 2404-2406.
 - Van Etten L, Van Lieshout L, Mansour MM and Deelder AM, 1997. A reagent strip antigen capture assay for the assessment of cure of schistosomiasis patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91, 154-155.
 - BB Obeng, YA Aryeetey, CJ de Dood, AS Amoah, IA Larbi, AM Deelder, M Yazdanbakhsh, FC Hartgers, DA Boakye, JJ Verweij, GJ van Dam and L van Lieshout. Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of Schistosoma haematobium in urine samples from Ghana. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, in press.
 - N Midzi, AE Butterworth, T Mduleza, S Munyaite, AM Deelder, GJ van Dam. The use of circulating cathodic antigen (CCA) strips for the diagnosis of urinary schistosomiasis. Submitted for publication.
 - Legesse M and Erko B, 2008. Field-based evaluation of a reagent strip test for diagnosis of Schistosomiasis Mansoni by detecting circulating cathodic antigen (CCA) in urine in low endemic area in ethiopia. Parasite 15, 151-155.

Basic studies of CCA in urine

- de Jonge N, Kreamsner PG, Krigger FW, Schommer G, Fillié YE, Kornelis D, van Zeyl RJ, van Dam GJ, Feldmeier H, Deelder AM. Detection of the schistosome circulating cathodic antigen by enzyme immunoassay using biotinylated monoclonal antibodies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84:815-8.
- Disch J, Garcia MM, Krigger GW, Amorim MN, Katz N, Deelder AM, Gryseels B, Raballo A. Daily fluctuation of levels of circulating cathodic antigen in urine of children infected with Schistosoma mansoni in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997; 91:222-5.
- Polman K, Engels D, Fathors L, Deelder AM, Gryseels B. Day-to-day fluctuation of schistosome circulating antigen levels in serum and urine of humans infected with Schistosoma mansoni in Burundi. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59:150-4.
- De Clercq D, Sacko M, Verduyck J, vanden Bussche V, Landouré A, Diarra A, Gryseels B, Deelder A. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine of mixed Schistosoma haematobium and S. mansoni infections in Office du Niger, Mali. Trop Med Int Health. 1997; 2:680-5.
- Polman K, Diakhate MM, Engels D, Nahimana S, Van Dam GJ, Falcão Ferreira ST, Deelder AM, Gryseels B. Specificity of circulating antigen detection for schistosomiasis mansoni in Senegal and Burundi. Trop Med Int Health. 2000; 5:534




Assessment of cure

- De Clercq D, Sacko M, Verduyck J, vanden Bussche V, Landouré A, Diarra A, Gryseels B, Deelder A. Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the Office du Niger, Mali. Acta Trop. 1997; 68:339-46.
- Kreamsner PG, Enyong P, Krigger FW, De Jonge N, Zotter GM, Thalhammer F, Mühlischlegel F, Bienzle U, Feldmeier H, Deelder AM. Circulating anodic and cathodic antigen in serum and urine from Schistosoma haematobium-infected Cameroonian children receiving praziquantel: a longitudinal study. Clin Infect Dis. 1994; 18:408-13.
- van Lieshout L, De Jonge N, Mansour MM, Bassyli S, Krigger FW, Deelder AM. Circulating cathodic antigen levels in serum and urine of schistosomiasis patients before and after chemotherapy with praziquantel. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993; 87:311-2.

Diagnosis of Bilharzia

- Creasey, AM, Wessels, JM, Clarke, VD. Re-evaluation of criteria for making a diagnosis of Bilharzia. Cent.Afr.J.Med.Nov. 1982; 28:265-272.
- Schneider, J, Fripp, PJ: The diagnosis of Bilharzia. S.Afr.Med.J.1977;51:536-540.

SIMBOLI

IVD	Solo per diagnostica in vitro		Solo per uso singolo
Cont.	Contenuto		Data di scadenza
LOT	Numero di lotto		Conservare a temperatura ambiente

Rev.: 28/04/2010 SW

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

RISULTATO NEGATIVO

La banda di controllo diventa rosa.

Non è presente nessuna banda del test T. Dimostra che il test è stato svolto correttamente, ma nessun antigene di schistosoma è stato individuato.



RISULTATO POSITIVO

La banda di controllo diventa rosa.

Una linea appare sull'area del test T.

Il test è positivo per gli antigeni dello schistosoma.



RISULTATO INVALIDO

La linea di controllo rimane blu

Solo se la linea di controllo è rosa il test può essere considerato positivo; altrimenti il test è invalido e deve essere ripetuto.



La linea del test senza linea di controllo.

Una linea di controllo rosa deve essere presente.



CONTROLLO QUALITÀ

Le procedure di controllo qualità (QC) devono essere svolte in conformità con le normative locali, statali e/o federali o requisiti di certificazione e le procedure standard di QC dei vostri laboratori.

LIMITAZIONI DEL TEST

- L'analisi di un singolo campione di test non deve essere usata come unico criterio per la diagnosi
- Nelle infezioni precoci potrebbero essere assenti livelli di antigeni rilevabili. Anche il peso del verme influenzerà la sensibilità del test.
- In casi sospetti di Schistosoma deve essere tenuto in considerazione che il test potrebbe essere un falso negativo durante la fase di sviluppo parassitario (6-7 settimane)
- In questi casi testare di nuovo od utilizzare altri metodi di analisi. Per questo motivo ulteriori analisi di risultati negativi sono importanti.
- Ematuria e pio-uria possono causare falsi positivi. È molto importante prelevare un campione in modo casuale durante il flusso urinario.
- La diagnosi finale deve essere basata sui risultati del test in congiunzione con altri rilevamenti clinici e di laboratorio.
- La presenza persistente o l'assenza di CCA nell'urina possono essere usate come metodo per determinare il successo o il fallimento della terapia.
- CCA nell'urina diminuisce solitamente già a partire dal giorno successivo e dovrebbe diventare introvabile 2-3 settimane dopo un trattamento efficace.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitività e specificità

La sensibilità del test varia con l'intensità dell'infezione. Paragonato allo standard di riferimento per *S. mansoni*, determinazione microscopica delle uova, per intensità più alte di 400 uova per grammo di feci, la sensibilità è il 100%. In casi scarsamente positivi, la sensibilità può scendere fino a circa il 70%. D'altra parte anche la determinazione delle uova è altamente variabile e perciò mostra una sensibilità decadente, risultante dal paragone di performance di entrambi i test nell'ambito. Per studi endemici, un singolo test dell'urina dimostra da vicino la reale prevalenza, prevista dai modelli basati su determinazioni multiple di conteggio a base di uova. La specificità in popolazioni endemicamente negative è normalmente intorno al 95%.

Livelli minimi rilevabili

nal von minden GmbH
Schikanederstraße 2 a
D-93053 Regensburg
Fon: +49 (941) 29010-0
Fax: +49 (941) 29010-50

nal von minden GmbH
Carl-Peschken-Str. 9
D-47441 Moers
Fon: +49 (2841) 99820-0
Fax: +49 (2841) 99820-1

Geschäftsführer: T. Zander,
R. Meißner, S. von Minden
Internet: www.nal-vonminden.de
E-Mail: info@nal-vonminden.de
FreeFax: (0800) 86 46 336

Registergericht Kleve
Handelsregister-Nr.: HRB 56 79
Steuer-Nr. 244/133/00130
UST-ID-Nr. DE 189 016 086