

MALARIA MBPan

Per uso diagnostico *in Vitro*

Test immunocromatografico rapido per la determinazione di Malaria P.f/P.v/P.o/P.m in sangue intero

I. DESTINAZIONE D'USO

Malaria MBPan è un test immunocromatografico rapido per la determinazione simultanea e la differenziazione di antigeni di *Plasmodium falciparum* (Pf), *P. vivax*, *P. ovale*, o *P. malariae* in campioni di sangue intero. Questo test serve come screening e come aiuto nella diagnosi di infezione da plasmodium.

II. INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

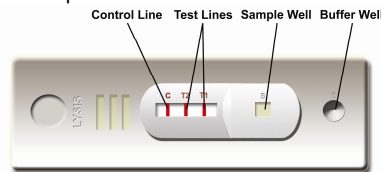
La malaria è una malattia infettiva trasmessa nell'uomo dalle zanzare, che colpisce oltre 200 milioni di persone e ne uccide più di un milione ogni anno. E' causata da quattro specie di protozoi del genere Plasmodium: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, e *P. malariae*. Tutti questi protozoi infettano e distruggono le cellule eritrocitarie umane, dando luogo a brividi, febbre, anemia e splenomegalia. Il *P. falciparum* è particolarmente pericoloso potendo causare infezioni letali anche in brevissimo tempo. Nonostante *P. falciparum* e *P. vivax* siano i patogeni più comuni, vi è una variabilità della distribuzione delle specie in funzione delle zone geografiche.¹

Tradizionalmente, la malaria viene diagnosticata con lo striscio di sangue periferico colorato con Giemsa, e le diverse specie di plasmodium sono distinte per la loro comparsa negli eritrociti infetti¹. Questa tecnica fornisce diagnosi accurate e affidabili, ma solo se effettuata da microscopisti qualificati e usando dei protocolli ben definiti²; ciò è un ostacolo per le zone remote e povere nel mondo.

Il kit Malaria MBPan risolve questo problema. Il test utilizza una coppia di anticorpi mono e policlonali di Proteina II ricca in Istidina (pHRP-II) specifica per *P. falciparum* e una coppia di anticorpi monoclonali di plasmodium Lattato deidrogenasi (pLDH), una proteina prodotta dalle quattro specie di plasmodium. In questo modo è possibile la determinazione simultanea e la differenziazione dell'infezione da *P. falciparum* e o ciascuna degli altri tre plasmodi³⁻⁶.

III. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit Malaria MBPan è un test immunocromatografico a flusso laterale. La strip all'interno della cassetta è composta da: 1) un pad colorato contenente anticorpi anti - pHRP-II di topo coniugati con oro colloidale (pHRP II-gold coniugati) e anticorpi anti-pLDH di topo coniugati con oro colloidale (pLDH-gold coniugati), 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-pLDH per poter determinare l'infezione di ciascuna delle quattro specie di plasmodium, la banda T2 è adsorbita con anticorpi policlonali anti-pHRP-II per la determinazione dell'infezione da Pf, e la banda C band è adsorbita con IgG di capra anti-topo.



Durante l'esecuzione del test, viene dispensato un volume adeguato di sangue nel pozzetto (S), poi si aggiunge un tampone di lisi nel pozzetto (B). Il tampone contiene un detergente che lisa i globuli rossi e rilascia gli antigeni di plasmodium, che migrano per capillarità lungo la strip di nitrocellulosa. Se nel campione è presente la proteina pHRP-II, essa si legherà al coniugato pHRP II-gold. L'immunocomplesso formatosi viene catturato dalla membrana dagli anticorpi anti-pHRP-II, formando una banda colorata a livello della T2, indicando il risultato positivo per *P. falciparum* Pf.

Se è presente la proteina pLDH, essa si legherà al coniugato con oro pLDH. L'immunocomplesso formatosi viene catturato dalla membrana dagli anticorpi anti pLDH, formando una banda colorata a livello della T1, indicando un risultato positivo al plasmodium. In presenza di una sola banda T (T1) il test è positivo per i soli *P. vivax*, *P. ovale*, e *P. malariae*.

L'assenza delle bande T1 e T2 indica un risultato negativo. Il test contiene un controllo interno (banda C) che si colora per la formazione dell'immunocomplesso anti-topo IgG / topo IgG (pHRP-II e pLDH-gold coniugati) indipendentemente dalla presenza delle bande test. Alternativamente il test non è valido e deve essere ripetuto.

IV. COMPONENTI

Ogni kit contiene tutto il necessario per effettuare 30 test (Codice VQ81706):

- 1) Test device-Card
- 2) Tampone Lisante in un flacone gocciolatore contenente tampone, detergente e sodio azide ($\text{NaN}_3 < 0.1\%$)
- 3) Minigocciolatore in plastica x 5 μL
- 4) Foglio istruzioni

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i reattivi sono pronti per l'uso. Il kit deve essere conservato a temperatura compresa tra 2° - 30°C. Non esporre sopra i 40°C. Non congelare il kit. Il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

VI. PRECAUZIONI

- 1) Questo test è stato progettato per uso diagnostico *in vitro* e solo per uso professionale.
- 2) Leggere attentamente le istruzioni prima di utilizzare il test.
- 3) Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata sulla confezione.
- 4) Non utilizzare un test che abbia la confezione danneggiata.
- 5) Portare i reattivi a temperatura ambiente (15°C-30°C) prima dell'uso.
- 6) Non utilizzare componenti di un altro kit
- 7) Si può utilizzare sangue emolizzato senza precipitati.
- 8) Indossare indumenti protettivi, come camici da laboratorio e guanti monouso, mentre si analizzano i campioni.
- 9) Maneggiare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Quando il test è stato completato, smaltire i campioni dopo averli autoclavati per almeno un ora. In alternativa, i campioni possono essere trattati con una soluzione di ipoclorito di sodio 0.5 - 1% per un ora prima di essere smaltiti.
- 10) Non mangiare, bere o fumare nella zona dove si utilizzano i campioni e i reattivi del kit.
- 11) Trattare i controlli come campioni di pazienti.
- 12) Leggere il test entro e non oltre 30 minuti.
- 13) Non eseguire il test in stanza con forte aria condizionata.

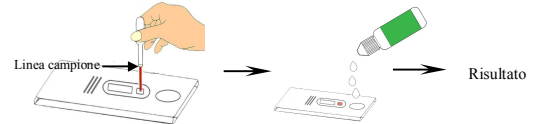
- 14) Eccesso di campione (>5 µL) può dare falsi positivi
 15) Una diagnosi definitiva deve essere confortata da altri parametri clinici.

VII. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Considerare qualsiasi materiale di origine umana come infettivo e maneggiarlo seguendo le procedure standard di biosicurezza. I campioni devono essere raccolti secondo le condizioni standard di prelievo e devono contenere un anticoagulante (EDTA, eparina) in caso di sangue venoso. Il sangue può essere raccolto anche con puntura sul dito. I campioni di sangue intero dovrebbero essere analizzati immediatamente. Se il test viene effettuato entro 72 ore dal prelievo, i campioni devono essere conservati in frigorifero (2 – 8°C). Per periodi più lunghi i campioni dovrebbero essere conservati a -20°C. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

VIII. PROCEDURA

1. Portare i campioni e i reattivi a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Se il campione era congelato, miscelare bene prima dell'uso.
2. Rimuovere il dispositivo dalla busta.
3. Identificare il dispositivo con i dati del paziente.
4. Raccogliere il campione con la pipetta di plastica monouso senza oltrepassare la linea campione indicata nella figura. Tenendola verticale, dispensare una goccia (circa 5 µL), evitando la formazione di bolle.



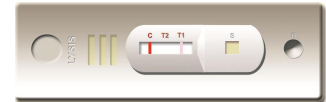
5 µL di campione di sangue 3 gocce di tampone Lisante 20-30 minuti

Nota: Fare pratica prima del test, se non si ha familiarità con il minicontagocce, per una migliore precisione utilizzare pipetta semiautomatica in grado di erogare 5µL di volume.

5. Aggiungere 3 gocce (100-150 µl) of di tampone Lisante nella finestra (buffer well-tampone finestra)
6. Leggere il risultato tra il 20° e il 30° minuto. Occorrono 20 minuti per eliminare l'eventuale sfondo colorato.

IX. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

NEGATIVO: Appare solo 1 banda colorata all'interno della finestra di lettura nella zona controllo (C)
 L'assenza della bande T test indica un risultato negativo



POSITIVO:

Nella finestra di lettura appaiono più bande colorate. Non importa quale banda appaia per prima; la presenza della banda nella zona test (T) associata alla presenza della banda nella zona di controllo (C) indica un risultato positivo:

T1: il test identifica la presenza di - pLDH II, il risultato positivo per , P.Vivax, P.ovale e P.malaria

T2: il test identifica la presenza di - pHRP II, il risultato positivo per , P.falciparum

T1- T2: : il test identifica la presenza sia di – pHRP II che di pLDH. Il risultato positivo per P.falciparum. (Vedere **punto 3** del paragrafo **Limiti del test**).



Un risultato positivo deve sempre essere confermato da metodi diagnostici alternativi e da evidenze cliniche prima di effettuare una diagnosi definitiva.

NON VALIDO: Nessuna banda appare nella zona controllo. In nessun caso un campione deve essere identificato come positivo se non si ha la formazione della banda di controllo. Se la banda di controllo non si forma, il test non è valido e deve essere ripetuto. una scorretta pratica procedurale o il deterioramento dei reagenti sono le cause più probabili della mancata comparsa della banda di controllo.



X. CARATTERISTICHE

1. Valutazione Clinica con campioni positivi al Pf

Un test di valutazione è stato condotto in Africa su 224 campioni di sangue confrontando il kit Malaria MBPan con il metodo che utilizza strisci di sangue. I risultati sono indicati in tabella.

Striscio di sangue	Malaria MBPan		Totale
	Positivo	Negativo	
Positive	24	0	24
Negative	3	197	200
Totale	27	197	224

Sensibilità Relativa: 100%, Specificità Relativa: 98.5%. Concordanza totale: 98.7%.

2. Valutazione Clinica con campioni positivi al Pv

Un test di valutazione è stato condotto in Africa su 224 campioni di sangue confrontando il kit Malaria MBPan con il metodo che utilizza strisci di sangue. I risultati sono indicati in tabella.

Striscio di sangue	Malaria MBPan		Totale
	Positivo	Negativo	
Positivo	9	0	9
Negativo	3	212	215
Totale	12	212	224

Sensibilità relativa: 100%, Specificità relativa 98,6 %, Concordanza totale: 98.7%

3. Specificità

Lo studio è stato condotto su tre diversi lotti con campioni di plasma, siero e sangue intero con concentrazioni di Trigliceridi fino a 500 mg/ml, Bilirubina fino a 10 mg/100ml, campioni emolizzati con Emoglobina fino a 10 mg/ml, Fosfatasi Acida Prostatica fino a 1000 ng/ml, Albumina fino a 20 mg/ml. Conclusioni: non si sono riscontrate interferenze nel test.

XI. LIMITI DELLA PROCEDURA













1. Seguire attentamente le istruzioni d'uso.
2. Il test per la Malaria è qualitativo e determina la presenza dei plasmodium protozoa antigeni in sangue intero. L'intensità della banda non è in correlazione con il titolo anticorpale.
3. **In caso di coinfezione di Pf con gli altri tre plasmodio, entrambe le bande T1 and T2 si svilupperanno. Il risultato va interpretato con cautela quando entrambe le bande T1 and T2 sono presenti.**
4. Un risultato negativo indica assenza di antigene rilevabile per il protozoo plasmodio. Tuttavia, un risultato negativo del test non esclude la possibilità di esposizione o di infezione da plasmodio.
5. Un risultato negativo si può verificare se la quantità di antigene del protozoo Plasmodium presente nel campione è inferiore ai limiti di rilevamento del test, o gli antigeni che vengono rilevati non sono presenti durante la fase di malattia in cui viene raccolto il campione.
6. Questo test è progettato per non essere influenzato da anticorpi umani anti-IgG murine (HAMA), comunque elevati titoli di Fattore Reumatoidi ed anticorpi esterofili possono influenzare i risultati.
7. Come per tutte le procedure diagnostiche, il medico deve confermare i dati ottenuti con questo test confrontandoli con dati ottenuti con altre metodiche cliniche.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Malaria, p. 421-424. Chapter 9. Infectious and Parasitic Diseases. Rubin E., Farber JL: Pathology, 2nd ed. 1994. J.B. Lippincott, Philadelphia.
2. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T, et al, Am J Trop Med. Hyp, 1999, Feb: 60(2):173-2
3. Guthmann JP, et al: Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002, 96(3):254-7
4. Kar I, Eapen A, Adak T, Sharma VP, Indian J Malariol. 1998, 35(3):160- 2
5. Mills CD, Burgess DC, Taylor HJ, Kain KC. Bull World Health Organ. 1999;77(7):553-9
6. Cloonan N, Fischer K, Cheng Q, Saul A. Mol Biochem Parasitol. 113(2):327-30

CONTENUTO

Test Device -Card	VQ81706 (30 test) 30 card
Tampone Lisante in un flacone gocciolatore	1 x 10 mL
Minigocciolatore in plastica x 5 µL	30 pz
Foglio istruzioni	1 pz

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

Codice Ramo CND W0104050202

