

RIDASCREEN® Malaria Ab-Screening

REF K8341



1. Uso previsto

Per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDASCREEN® Malaria Ab-Screening è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi IgG o IgM contro *Plasmodium spp.* in siero o plasma umano.

Il test è indicato nei casi di sospetta infezione da *Plasmodium*.

2. Sintesi e spiegazione del test

La malaria è una malattia potenzialmente mortale causata dal protozoo *Plasmodium spp.* Viene trasmessa dalla zanzara anofele. Le infezioni si possono contrarre anche attraverso trasfusioni di sangue. Le specie del parassita che possono infettare l'uomo sono quattro: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. *Plasmodium falciparum* causa forme potenzialmente mortali di malaria ed è il tipo più comune insieme a *P. vivax*. La malattia si riscontra prevalentemente nelle regioni tropicali e subtropicali. Come conseguenza della risposta del sistema immunitario, dopo essere stato infettato dal plasmodio l'organismo produce anticorpi specifici contro il patogeno. Questi anticorpi possono essere determinati nel siero con l'aiuto di metodi immunologici. La selezione dell'antigene patogeno-specifico utilizzato e il metodo analitico applicato sono importanti per la validità di un test. La determinazione degli anticorpi è più sensibile rispetto alla determinazione diretta del patogeno ad esempio con l'osservazione al microscopio, ed è indipendente dallo stato della parassitemia. Per la determinazione vengono usati antigeni ricombinanti di *P. falciparum* e *P. vivax*. Data la similarità antigenica fra le specie di plasmodio, sfruttando la sensibilità crociata il test dovrebbe consentire anche la determinazione di *P. ovale* e *P. malariae*.

3. Principio del test

Gli antigeni ricombinanti si legano su una piastra da microtitolazione. Gli anticorpi nei campioni dei pazienti si legano agli antigeni, e in una fase successiva vengono individuati utilizzando un anticorpo anti-umano coniugato **Conjugate** marcato con un enzima. L'enzima trasforma un substrato incolore (H_2O_2/TMB) in un prodotto finale blu. La reazione enzimatica viene bloccata dall'aggiunta di acido solforico. 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).

4. Contenuto della confezione

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

			K8341
Plate	96 test	Piastra da microtitolazione; 12 strisce di micropozzetti (divisibili) in un telaio di fissaggio; rivestimento con antigeni ricombinanti di plasmodio (<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>)	X
Diluent	100 ml	Tampone di diluizione, pronto per l'uso; tampone fosfato, di colore giallo	X
Wash	50 ml	Tampone di lavaggio, concentrato 20 X; tampone fosfato	X
Control + <i>Tappo rosso</i>	2 ml	Controllo positivo, pronto all'uso; siero o plasma umano diluito; di colore giallo	X
Control - <i>Tappo blu</i>	2 ml	Controllo negativo, pronto all'uso; siero o plasma umano diluito; di colore giallo	X
Cut-off <i>Tappo verde</i>	3 ml	Controllo cut-off, pronto all'uso; siero o plasma umano diluito; di colore giallo	X
Conjugate <i>Tappo nero</i>	20 ml	Coniugato IgG/IgM anti-umane, pronto all'uso; anticorpi coniugati con perossidasi; di colore blu	X
Substrate <i>Tappo giallo</i>	15 ml	Substrato, pronto all'uso; H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto all'uso	X
Stop <i>Tappo rosso</i>	15 ml	Reagente di bloccaggio; acido solforico 0,2 mol/l; pronto per l'uso	X

Le informazioni sulle sostanze pericolose sono conformi ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli consultare le schede dati di sicurezza (SDS) su 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. Conservare le strisce da microtitolazione non necessarie nella busta di alluminio chiusa.

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

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 può 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 dei 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.

I sieri di controllo presenti nel kit (controllo positivo, controllo cut-off e controllo negativo) sono stati testati per HIVAb, HCVAb 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.

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

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Questo test è stato sviluppato per l'esame di campioni di siero e plasma umani. 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 o plasma non diluito		Siero o plasma 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 reinserire il reagente in eccesso nel contenitore perché questo può causare contaminazione. Le strisce da microtitolazione non possono 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.

9.2. Preparazione del tampone di lavaggio

Miscelare 1 parte di concentrato per tampone di lavaggio **Wash** con 19 parti di acqua distillata. A questo scopo, aggiungere 50 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 dura per cinque giorni se conservato a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparazione dei campioni

I campioni di siero o plasma da analizzare saranno diluiti con il diluente del campione **Diluent** 1 + 100 prima dell'inizio del test.

Ad esempio, 10 µl di siero + 1 ml di diluente **Diluent**

Attenzione!

Il controllo cut-off, il controllo negativo e il controllo positivo sono pronti all'uso e non devono essere diluiti.

9.4. Prima incubazione

Inserire un numero sufficiente di cavità nel telaio e pipettare in ciascuna 100 µl di sieri diluiti e controlli pronti all'uso **Control -** , **Control +** e cut-off **Cut-off** nei pozzetti corrispondenti, ad esclusione di A1 (valore bianco del substrato). Si consiglia di eseguire il controllo cut-off **Cut-off** in duplicato. La piastra sarà incubata in un incubatore per 60 minuti a 37 °C. La base dei pozzetti non deve rimanere a contatto con materiali che conducono facilmente calore. Durante l'incubazione, la piastra da microtitolazione deve essere coperta con la pellicola protettiva fornita.

A1	Valore bianco del substrato
B1	Controllo negativo
C1	Controllo cut-off
D1	Controllo cut-off
E1	Controllo positivo
F1,G1	Siero del paziente 1, 2, ecc.

Attenzione!

Non collocare la piastra da microtitolazione in un contenitore di incubazione freddo che non sia riscaldato a 37 °C prima dell'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. Successivamente lavare la piastra tre volte utilizzando 300 µl di tampone di lavaggio per volta. 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 **Conjugate** a tutti i pozzetti escluso A1 (valore bianco del substrato). Quindi incubare la piastra per 30 minuti al buio a temperatura

ambiente (20 - 25 °C). Durante l'incubazione, la piastra da microtitolazione deve essere coperta con la pellicola protettiva fornita.

9.7. Lavaggio

Lavare tre volte come descritto al punto 9.5.

9.8. Terza incubazione

Aggiungere 100 µl di substrato **Substrate** a tutti i pozzetti, incluso A1 (valore bianco del substrato). Successivamente incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Quindi aggiungere 100 µl di reagente bloccante **Stop** a tutti i pozzetti per interrompere la reazione; questa operazione farà virare il colore da blu a giallo. 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). Il valore nullo viene confrontato con il valore bianco del substrato (posizione A1).

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

Per il controllo della qualità, i controlli positivo, negativo e cut-off devono essere eseguiti ogni volta che viene eseguito il test. Il controllo cut-off viene eseguito in duplicato e il valore medio viene determinato dalle due singole misurazioni. Il test è stato eseguito correttamente quando i valori di estinzione (OD) dei controlli soddisfano i seguenti criteri:

Tab. 3: Criteri per il controllo della qualità

	OD
Valore bianco del substrato	<0,100
Controllo negativo	<0,200 e <cut-off
Controllo cut-off	0,150-1,300
Controllo positivo	>cut-off

Una deviazione dai valori attesi, nonché torbidità o colorazione blu del substrato incolore 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

11.1. Calcolo dell'indice del campione

- 1 Viene calcolato il valore medio di estinzione del controllo cut-off.
- 2 Dividere l'estinzione del campione del paziente per il valore medio di estinzione calcolato del controllo cut-off.

Per esempio: Controllo cut-off 1 OD = 0,440
 Controllo cut-off 2 OD = 0,420
 Valore medio: = 0,430
 Campioni OD = 1,591

$$\text{Indice del campione} = \frac{1,591}{0,430} \times 10 = 37$$

Tab. 4: Analisi dell'indice del campione

	Negativo	Borderline	Positivo
Indice del campione	<9	09-11	>11

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Malaria Ab-Screening Elisa individua gli anticorpi delle classi IgG e IgM verso *Plasmodium spp.* Non è possibile stabilire una connessione tra l'entità del valore di estinzione misurato e la presenza o la gravità dei sintomi clinici. I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in relazione ai segni e sintomi clinici.

Un risultato negativo non esclude un'infezione esistente. In una fase precoce dell'infezione, la produzione di anticorpi può essere ancora così bassa che il test per la loro determinazione potrebbe essere negativo. In caso di sospetto clinico sarà quindi necessario testare un campione di siero di follow-up.

In generale, per migliorare la validità diagnostica dei test sierologici occorre eseguire due test consecutivi su siero del paziente. Per l'interpretazione di un riscontro è importante l'andamento del titolo.

Un risultato positivo non esclude la presenza di un altro patogeno infettivo come causa di una malattia.

Non è possibile escludere reattività crociata con gli anticorpi verso altri protozoi come Trypanosoma, Leishmania e Toxoplasma.

13. Caratteristiche di prestazione

Tab. 5: Varianza inter-analisi (n = 12)

Varianza inter-analisi		
	U/ml	CV
Siero 1	26,2	5,1%
Siero 2	22,7	7,2%
Siero 3	6,2	11,5%

Tab. 6: Varianza intra-analisi (n = 24)

Varianza intra-analisi		
	OD	CV
Siero 1	0,456	10,2%
Siero 2	1,072	2,7%
Siero 3	0,931	4,5%

Tab. 7: Sensibilità e specificità










Sensibilità	95,9%
Specificità	97,5 %

14. Cronologia delle versioni


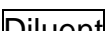

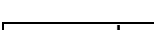

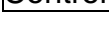
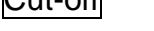
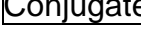

Numero della versione	Capitolo e designazione
2017-12-13	Versione di rilascio
2018-06-21	10. Controllo qualità – indicazioni di instabilità o deterioramento dei reagenti

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 di diluizione
	Tampone di lavaggio
	Controllo positivo
	Controllo negativo
	Controllo cut-off
	Coniugato IgG/IgM anti-umane
	Substrato
	Reagente di bloccaggio

16. Bibliografia

1. *Bruce-Chwatt, L. J.* (1982): Transfusion malaria revisited. In *Tropical diseases bulletin* 79 (10), pp. 827-840.
2. *Chiodini, P. L.; Hartley, S.; Hewitt, P. E.; Barbara, J.A.; Lalloo, K.; Bligh, J. Voller, A.* (1997): Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion-transmitted malaria. In *Vox sanguinis* 73 (3), pp. 143-148.
3. *Dodd, R. Y.* (1998): Transmission of parasites by blood transfusion. In *Vox sanguinis* 74 Suppl 2, pp.161-163.
4. *Doderer, C.; Heschung, A.; Guntz, P.; Cazenave, J-P.; Hansmann, Y.; Senegas, A. et al.* (2007): A new ELISA kit which used a combination of Plasmodium falciparum extract and recombinant Plasmodium vivax antigens as an alternative to IFAT for detection of malaria antibodies. In *Malaria journal* 6, p.19. DOI: 10.1186/1475-2875-6-19.
5. *Hoffmann, S. L.; Campell, C.; White, N. J.* (2006): Malaria. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 1024-1062.