

## Δοκιμασία ταχείας διάγνωσης ελονοσίας Malaria P.f./Pan Ag Rapid Test Cassette, “One Step Rapid Test”, HEALGEN

- Η δοκιμασία ανιχνεύει το παράσιτο της ελονοσίας σε δείγμα αίματος ανθρώπου.
- Μπορεί να διαφοροδιαγνώσει λοίμωξη από *P.falciparum* από τα άλλα είδη πλασμοδίου, *P.vivax*, *P.ovale* και *P.malariae*.

### Αρχές μεθόδου:

Η δοκιμασία αποτελείται από μία μεμβράνη που είναι προεπικαλυμμένη i) με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη HRP-II (πρωτεΐνη II πλούσια σε ιστιδίνη) του *P.falciparum* σε συγκεκριμένη περιοχή της δοκιμασίας που σημαίνεται ως «Pf», και ii) με μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την πλασμοδιακή γαλακτική δεϋδρογονάση (pLDH) που ανευρίσκεται σε όλα τα είδη πλασμοδίου (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* και *P.malariae*) σε συγκεκριμένη περιοχή της δοκιμασίας που σημαίνεται ως «Pan».

Μετά την εισαγωγή του δείγματος αίματος και του διαλύτη (για τη λύση των ερυθρών), τα αντιγόνα των ερυθρών μετακινούνται χρωματογραφικά (τριχοειδικά) σε όλη την ταινία. Εάν στο δείγμα αίματος υπάρχει η πρωτεΐνη pLDH θα δεσμευθεί από το αντίστοιχο αντίσωμα στη μεμβράνη, δημιουργώντας μία ορατή κόκκινη γραμμή στην περιοχή «Pan», που υποδηλώνει θετικό «Pan» αποτέλεσμα. Κατά αντιστοιχία, η πρωτεΐνη HRP-II -εάν υπάρχει στο δείγμα αίματος- θα δεσμευθεί από το αντίστοιχο αντίσωμα στη μεμβράνη, δημιουργώντας μία ορατή κόκκινη γραμμή στην περιοχή «Pf», που υποδηλώνει θετικό «Pf» αποτέλεσμα.

Απουσία γραμμών υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα. Η δοκιμασία περιέχει τεστ εσωτερικού ελέγχου στην περιοχή που σημαίνεται ως «C» (control), στην οποία **πρέπει πάντα να φαίνεται** μία κόκκινη γραμμή, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη άλλων γραμμών, για να θεωρηθεί ότι η διαδικασία έγινε σωστά. Αλλιώς, το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο και το δείγμα πρέπει να επανεξετασθεί με άλλη δοκιμασία.

### Παρεχόμενα υλικά σε κάθε κουτί:

- 25 σφραγισμένα σακουλάκια αλουμινίου, το καθένα των οποίων περιλαμβάνει: μία δοκιμασία (test cassette), μία μικρή πλαστική πιπέτα, και ένα φακελάκι με αποξηραντικό.
- Ένα φιαλίδιο με διαλύτη («Buffer»).
- Ένα φύλλο οδηγιών (στα αγγλικά).

### Επιπρόσθετα υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κουτί:

- Ρολόι ή χρονόμετρο.
- Αποστειρωμένος σκαρφιστήρας για λήψη τριχοειδικού αίματος.
- Σωληνάριο γενικής αίματος για λήψη ολικού αίματος με φλεβοκέντηση.
- Τολύπια βάμβακος και οινόπνευμα
- Προστατευτικά γάντια
- Δοχείο απόρριψης μολυσματικών αποβλήτων
- Δοχείο απόρριψης αιχμηρών μολυσματικών αποβλήτων

### Οδηγίες φύλαξης και συντήρησης:

Μην ανοίγετε τα σφραγισμένα σακουλάκια με τις δοκιμασίες πριν τη χρήση τους.

Τα σακουλάκια με τις δοκιμασίες και τα άλλα περιεχόμενα υλικά του κουτιού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία **μεταξύ 2°C και 30° C**. Μην καταψύχετε το κουτί ή τα περιεχόμενά του. Όταν τα σακουλάκια με τις δοκιμασίες ή το φιαλίδιο διαλύτη φυλάσσονται στο ψυγείο, θα πρέπει να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15-30° C) πριν ανοιχθούν.

## Οδηγίες προφύλαξης - Προειδοποιήσεις:

- Μην χρησιμοποιείτε τις δοκιμασίες εάν η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει.
- Ακολουθείτε πιστά τις οδηγίες χρήσης για να έχετε αξιόπιστα αποτελέσματα.
- Τηρείτε τις ενδεικνυόμενες οδηγίες προφύλαξης κατά το χειρισμό των δειγμάτων αίματος.
- Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε στο χώρο που χειρίζεστε δείγματα ή δοκιμασίες.
- Αιμολυμένο αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμασία, αλλά μην παίρνετε ιζήματα.
- Οι δοκιμασίες είναι ευαίσθητες σε ζέστη και υγρασία, και μπορεί να δώσουν αναξιόπιστα αποτελέσματα.
- Μην κάνετε τη δοκιμασία σε δωμάτιο με δυνατή ροή αέρα, π.χ. ανεμιστήρα ή δυνατό air-condition.
- Η απόρριψη των δοκιμασιών, χρησιμοποιηθέντων και μη, καθώς και όλων των μολυνθέντων με αίμα υλικών, γίνεται σε δοχείο απόρριψης μολυσματικών αποβλήτων (biohazard container).

## Διαδικασία ελέγχου – Οδηγίες:

1. Ανοίξτε το κουτί το οποίο περιέχει 25 δοκιμασίες σε σακουλάκια αλουμινίου και ένα φιαλίδιο με διαλύτη.
2. Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες χρήσης της δοκιμασίας Malaria P.f./Pan Ag Rapid Test Cassette, “One Step Rapid Test”, HEALGEN.
3. Εξασφαλίστε τα παρακάτω απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται στο κουτί: προστατευτικά γάντια, αποστειρωμένο σκαρφιστήρα (για λήψη τριχοειδικού αίματος), τολύπια βάμβακος και οινόπνευμα, χρονόμετρο ή ρολόι, δοχείο απόρριψης μολυσματικών αποβλήτων, δοχείο απόρριψης αιχμηρών μολυσματικών αποβλήτων.
4. Ελέγξτε την ημερομηνία λήξης στο κουτί και στο πίσω μέρος σε κάθε σακουλάκι αλουμινίου (προσοχή: στην ημερομηνία λήξης αναγράφεται πρώτα το έτος λήξης και μετά ο μήνας λήξης).
5. **Η δοκιμασία, το δείγμα και ο διαλύτης πρέπει να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (15°C-30° C) πριν ξεκινήσει ο έλεγχος.**
6. Ανοίξτε ένα σακουλάκι αλουμινίου, αφαιρέστε τη δοκιμασία (test cassette) και χρησιμοποιήστε την όσο πιο γρήγορα γίνεται. Για καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιήστε τη δοκιμασία εντός μίας ώρας (αφού ανοιχθεί το σακουλάκι).
7. Τοποθετήστε τη δοκιμασία επάνω σε καθαρή και επίπεδη επιφάνεια. Σημειώστε πάνω στη δοκιμασία (test cassette), με μολύβι, στυλό ή ανεξίτηλο μαρκαδόρο, το ονοματεπώνυμο του ασθενούς ή τον κωδικό του δείγματος (αν υπάρχει) και την ημερομηνία (αργότερα θα σημειώσετε και την ακριβή ώρα έναρξης του τεστ, ώρα και λεπτά).
8. **Λήψη δείγματος αίματος και συντήρηση:** Φορέστε τα γάντια.
  - A. Συλλογή δείγματος αίματος με φλεβοκέντηση (αιμοληψία με σύριγγα):**
    - i. Συλλέξτε ολικό αίμα με φλεβοκέντηση σε σωληνάριο συλλογής αίματος που περιέχει αντιπηκτικό (EDTA, ηπαρίνη ή κιτρικά) - σωληνάριο «γενικής αίματος».
    - ii. Εάν τα δείγματα αίματος δεν εξεταστούν άμεσα, πρέπει να φυλαχθούν σε θερμοκρασία ψύξης (2-8°C), δηλαδή στο ψυγείο, στην απλή συντήρηση (όχι στην κατάψυξη). Εάν τα δείγματα ολικού αίματος φυλάχθηκαν σε θερμοκρασία ψύξης (2-8°C), θα πρέπει να ελεγχθούν εντός τριών ημερών.

Για περιόδους φύλαξης άνω των τριών ημερών, συνιστάται να γίνει πήξη των δειγμάτων, δηλαδή φύλαξή τους σε θερμοκρασία κατάψυξης. Χρήση των δειγμάτων μετά από μακρύ χρόνο φύλαξης άνω των τριών ημερών μπορεί να προκαλέσει μη ειδική αντίδραση.

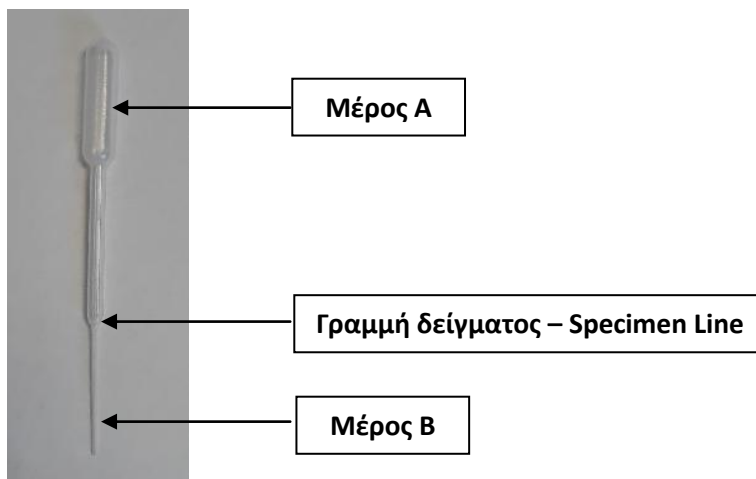
Τα δείγματα θα πρέπει να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση – εξέτασή τους.
    - iii. Η ποσότητα ολικού αίματος που θα πρέπει να ληφθεί από το σωληνάριο και να χρησιμοποιηθεί στη δοκιμασία είναι **5μl**.

## B. Συλλογή δείγματος αίματος με σκαρφιστήρα (lancet):

- i. Καθαρίστε την περιοχή του δακτύλου του ασθενούς που θα τρυπηθεί με τον σκαρφιστήρα με μαντηλάκι ή τολύπιο βάμβακος εμποτισμένο σε οινόπνευμα. Αφήστε να εξατμιστεί το οινόπνευμα πριν τρυπήσετε το δάκτυλο του ασθενούς.
- ii. Πιέστε την άκρη του -κατά προτίμηση μέσου ή παράμεσου- δακτύλου και τρυπήστε με τον αποστειρωμένο σκαρφιστήρα (ή βελόνα) για να πάρετε τριχοειδικό αίμα.
- iii. Πετάξτε τον σκαρφιστήρα (ή τη βελόνα) στο ειδικό δοχείο απόρριψης αιχμηρών μολυσματικών αποβλήτων.
- iv. Πιέστε το δάκτυλο χαμηλότερα από το σημείο που τρυπήσατε για να βγει μια επαρκής σταγόνα αίματος.
- v. Σκουπίστε την πρώτη σταγόνα αίματος με μια αποστειρωμένη γάζα ή τολύπιο βάμβακος.
- vi. Πιέστε το δάκτυλο ξανά για να βγει μια δεύτερη επαρκής σταγόνα αίματος (προσέξτε να μην τρέξει το αίμα στο πλάι του δακτύλου, και να παραμείνει η σταγόνα αίματος «αυτούσια» πάνω στο δάκτυλο).
- vii. Χρησιμοποιήστε τη μικρή πλαστική πιπέτα των 5μl (που περιλαμβάνεται στο σακουλάκι, Εικόνα 1), και αναρροφήστε δείγμα ολικού αίματος, μέχρι το αίμα να περάσει/ υπερβεί τη **γραμμή του δείγματος - Specimen Line** (Εικόνες 1 και 2).

Πιο αναλυτικά για τη λειτουργία της πιπέτας: πιέζοντας (σταθερά) ελαφρώς το πιο φουσκωτό μέρος της πιπέτας της - «Μέρος Α» (Εικόνα 1), για να αφαιρεθεί λίγος αέρας, βυθίστε το ανοιχτό άκρο του πιο λεπτού μέρους της πιπέτας -«Μέρους Β» (Εικόνα 1)- μέσα στη σταγόνα του αίματος και μετά μειώστε σιγά-σιγά την πίεση που ασκείτε στο «Μέρος Α», για να αναρροφήσετε αίμα μέσα στην πιπέτα, **μέχρι το αίμα να υπερβεί τη «Γραμμή δείγματος - Specimen Line»** (Εικόνα 1), δηλαδή μέχρι να γεμίσει όλο το πολύ λεπτό μέρος της («Μέρος Β»).

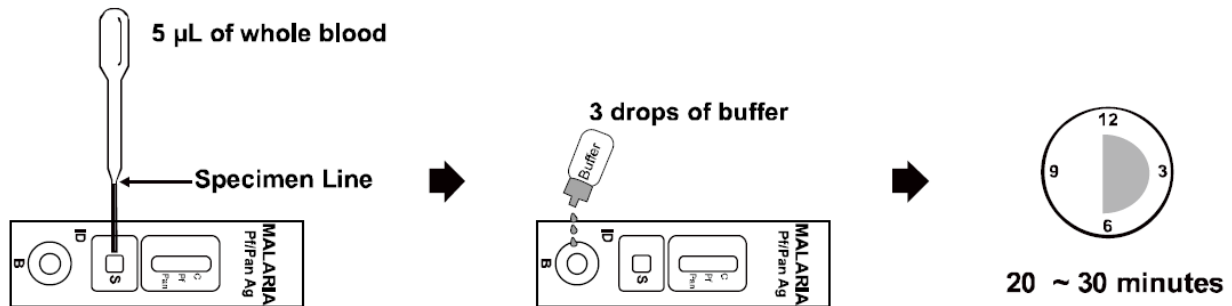
**Εικόνα 1:** Μικρή πλαστική πιπέτα



9. Μεταφέρετε το **δείγμα ολικού αίματος** που αναρροφήσατε στο **τετράγωνο πηγαδάκι εισαγωγής του δείγματος**, στη **θέση «S»** (Εικόνα 2). Για να βγει το αίμα από την πιπέτα, πιέστε ελαφρώς το φουσκωτό μέρος -«Μέρος Α» της πιπέτας, αφού έχετε τοποθετήσει το ανοιχτό άκρο του «Μέρους Β» στη θέση «S».
10. Προσθέστε αμέσως μετά τρεις (3) σταγόνες (περίπου 120 μL) του **διαλύτη («Buffer»)** στο **κυκλικό πηγαδάκι εισαγωγής διαλύματος**, στη **θέση «B»** (Εικόνα 2).

*Σημείωση: Συνίσταται να εξασκηθείτε μερικές φορές πριν την εκτέλεση της δοκιμασίας εάν δεν είστε εξοικειωμένοι με τη χρήση της μικρής πλαστικής πιπέτας. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, μπορεί να γίνει μεταφορά του δείγματος με πιπέτα ικανή να διανέμει 5 μL όγκου.*

Εικόνα 2: Διαδικασία ελέγχου



11. Πετάξετε την πιπέτα στο ειδικό δοχείο απόρριψης μολυσματικών αποβλήτων.
12. **Κρατήστε χρόνο:** Σημειώστε (με μολύβι, στυλό ή ανεξίτηλο μαρκαδόρο) επάνω στη δοκιμασία την ώρα έναρξης του ελέγχου (ώρα και λεπτά), αμέσως αφού προσθέσετε το διαλύτη.  
Εάν προτιμάτε, μετά από πέντε (5) λεπτά από την προσθήκη δείγματος αίματος και διαλύτη, μπορείτε να προσθέσετε μία ακόμη σταγόνα διαλύτη (Buffer) για να γίνει πιο «καθαρό» το πλαίσιο το φόντο στο παραθυράκι του αποτελέσματος.
13. Το αποτέλεσμα μπορεί να διαβαστεί **μεταξύ 20 και 30 λεπτών** (Εικόνα 2). Μπορεί να χρειαστεί περισσότερο από 20 λεπτά για να γίνει πιο «καθαρό» το φόντο στο παραθυράκι ανάγνωσης του αποτελέσματος. Όταν το αρχικό αποτέλεσμα είναι αρνητικό στα 20 λεπτά, η δοκιμασία δεν θα πρέπει να απορρίπτεται, αλλά να επαναλαμβάνεται η ανάγνωση του αποτελέσματος στα 30 λεπτά!  
**Μην διαβάσετε το αποτέλεσμα μετά από 30 λεπτά.** Απορρίψτε τη δοκιμασία μετά την ανάγνωση του αποτελέσματος (για να μη δημιουργηθεί σύγχυση), στο ειδικό δοχείο απόρριψης μολυσματικών αποβλήτων.

Ερμηνεία του αποτελέσματος (Εικόνα 3):

1. **Θετικό αποτέλεσμα:**

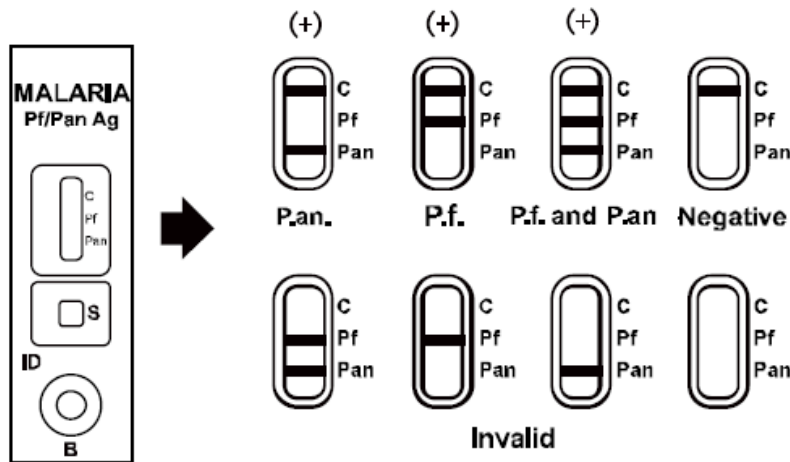
- i. **Θετικό για *P.falciparum* ή για μεικτή λοίμωξη (από *P.falciparum*, και *P.vivax* ή *P.ovale* ή *P.malariae*):** Εμφάνιση τριών έγχρωμων γραμμών στο παραθυράκι ανάγνωσης του αποτελέσματος - εμφανίζεται μία γραμμή στην περιοχή C (control), μία γραμμή στην περιοχή Pf και μία γραμμή στην περιοχή Pan.
- ii. **Θετικό για *P.falciparum*:** Εμφανίζεται μία γραμμή στην περιοχή C (control) και μία γραμμή στην περιοχή Pf.
- iii. **Θετικό για *Plasmodium vivax* ή *P.malariae* ή *P.ovale*:** Εμφανίζεται μία γραμμή στην περιοχή C (control) και μία γραμμή στην περιοχή Pan.

2. **Αρνητικό αποτέλεσμα:** Εμφανίζεται μόνο μία έγχρωμη γραμμή στην περιοχή C (control).

3. **Μη έγκυρο αποτέλεσμα:** Δεν εμφανίζεται / δεν είναι ορατή η γραμμή στην περιοχή C (control). Οι πιο πιθανές αιτίες για την απουσία της γραμμής στην περιοχή C είναι ο ανεπαρκής όγκος δείγματος αίματος ή λανθασμένες τεχνικές στη διαδικασία. **Εάν δεν εμφανιστεί έγχρωμη γραμμή στην περιοχή C, το δείγμα πρέπει να επανεξετασθεί με νέα δοκιμασία.** Εάν το πρόβλημα παραμένει/ επαναλαμβάνεται, μην χρησιμοποιείτε το συγκεκριμένο κουτί και επικοινωνήστε με το ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ. (τηλ. 210 8899052, 210 8899072).

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Αξιολογείται ακόμη και η πολύ αχνή γραμμή στο παραθυράκι ανάγνωσης, γι' αυτό και θα πρέπει να ελέγχουμε το αποτέλεσμα με πολύ προσοχή και με καλό φωτισμό.

Εικόνα 3: Ερμηνεία αποτελέσματος



#### Περιορισμοί - Επισημάνσεις:

1. Είναι γνωστό ότι δείγματα με αιμόλυση, με ρευματοειδή παράγοντα, λιπαιμικά και ικτερικά δείγματα μπορεί να οδηγήσουν σε αλλοιωμένα - επισφαλή αποτελέσματα κατά τη διενέργεια δοκιμασιών ταχείας διάγνωσης ελονοσίας, λόγω αλληλεπιδράσεων. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη εταιρεία, σε μελέτες που έγιναν με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, δεν υπήρξαν αλληλεπιδράσεις σε τέτοια δείγματα.
2. Σε μερικές περιπτώσεις, στις οποίες είναι θετικό το αποτέλεσμα στην περιοχή Pf και αρνητικό στην περιοχή Pan, υπάρχει το ενδεχόμενο να πρόκειται για περιστατικό ελονοσίας που έχει πρόσφατα θεραπευθεί. Ωστόσο, τέτοιο αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει και σε μερικές περιπτώσεις μη θεραπευθείσας ελονοσίας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, συνιστάται επανάληψη του ελέγχου μετά από δύο (2) ημέρες.
3. Παρόλο που η δοκιμασία είναι πολύ ακριβής στην ανίχνευση αντιγόνων ειδικών για τα είδη των πλασμοδίων, υπάρχει μικρή πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων.
4. **Επισημαίνεται ότι ένα μεμονωμένο αρνητικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία ταχείας διάγνωσης δεν αποκλείει τη διάγνωση της ελονοσίας.**

Οι δοκιμασίες ταχείας διάγνωσης ελονοσίας αποτελούν συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδο στη μέθοδο αναφοράς (μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος αίματος). Ως εκ τούτου, **σε περίπτωση ύποπτου κρούσματος, συνιστάται ο έλεγχος να περιλαμβάνει και μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος αίματος (και να μην περιορίζεται στη χρήση της δοκιμασίας), και να γίνεται συναξιολόγηση όλων των κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων.**

Επιπρόσθετα, σε ύποπτο κρούσμα ελονοσίας, συνιστάται **επανελέγχος του ασθενούς για ελονοσία** (με δοκιμασία ταχείας διάγνωσης ή και μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος αίματος) κάθε 8 - 12 ώρες για 2 - 3 συνεχείς ημέρες, ιδανικά επί εμπυρέτου ή ρίγους (θα πρέπει να ελεγχθούν τουλάχιστον **τρία** δείγματα).

Σε κάθε περίπτωση ύποπτου κρούσματος ελονοσίας, όταν δεν υπάρχει η δυνατότητα ασφαλούς επιβεβαίωσης του αρνητικού αποτελέσματος σε τοπικό επίπεδο ή όταν έχουμε θετικό αποτέλεσμα (για περαιτέρω τυποποίηση), συστήνουμε να στέλνονται άμεσα δείγματα του ασθενούς (ολικό αίμα με αντιπηκτικό, ληφθέν πριν την έναρξη θεραπείας, σε συνθήκες ψύξης και επιχρίσμα αίματος - «πλακάκι»), στον Τομέα Παρασιτολογίας, Εντομολογίας και Τροπικών Νοσημάτων της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας, κατόπιν επικοινωνίας με αυτόν (τηλ. 213 2010318, 2132010325).