Kapillery™

Staining kit for the detection of haemoparasites with fluorescence microscopy.

Lets Create a Malaria Free World Together !!

Florotek Biosystems

Kapillery™

History

Malaria is a protozoal disease transmitted by Anopheles mosquito caused by minute parasite protozoa of the genus plasmodium which infect human and insect hosts alternatively. It is a very old disease and pre historic man is thought to have suffered from malaria. It probably originated in Africa and accompanied human migration to the Mediterranean shores, India and south East Asia. In the past it is used to be common in the marshy areas around Rome and the name is derived from the Italian, (mal-aria) or "bad air," it was also known as Roman fever. Today some 500 hundred million people in Africa, India, South East Asia and South America are exposed to endemic malaria and it is estimated to cause two and half million deaths annually, one million of which are children.

Clinical Features

Clinical Features of malaria include fever, chills, rigors, headache, vomiting etc.

Diagnosis

Early, rapid diagnosis of malaria is gaining increasing importance in health programs in endemic countries in response to increasing drug costs and recognition of the importance of early, correct treatment to the reduction in malaria morbidity and mortality. The

most important method of diagnosis is the identification of malaria parasite in the peripheral blood. It is not essential to wait until the height of the fever to take blood for testing, if malaria is suspected, a blood specimen must be examined urgently. Also one negative test does not exclude malaria, if there is clinical doubt repeated tests are necessary. Improvements in malaria diagnostics should facilitate the identification of individuals infected with the malarial parasites and treatment of such cases with appropriate drugs.

Traditional diagnosis, based on the examination of giemsa-stained thick and thin blood smears under a microscope is labour intensive, time consuming and may give poor results in cases with low parasitaemia.

In recent years numerous quick and new techniques for malaria diagnosis have been developed.

Technique of diagnosing haemoparasites based on microcentrifugation, fluorescence and density gradient of infected red blood cells has an advantage in terms of speed, ease, reliability and sensitivity in diagnosis of malaria. In addition, it has been of immense help in identifying the infective carriers with a very low parasite burden.

" KAPILLERY ™ is based on this technique.

Principle of staining

Malarial parasite when stained with acridine orange gives differential staining of nuclear DNA in green and of cytoplasmic RNA in red which allows recognition of parasite.

Composition of KAPILLERY™

The KAPILLERY™ kit contains following

- A.O. Tubes
- Tube Plugs
- Tube Suspenders
- Forceps
- Immersion oil
- Package Insert

Specimen for investigation

Capillary blood specimen / Venous blood specimen.

Additional Requirement

1. Fluorescence Microscope with 60 X objective.
   Recommended Filter combinations

Excitation Filter	485-570 nm
Dichromatic Mirror	505-635 nm
Suppression Filter	505-600 nm

2. Tube Holder.
3. Forceps.
4. Immersion Oil.

Specimen Collection

WARNING : BLOOD SPECIMENS MAY CONTAIN THE HEPATITIS B VIRUS OR HUMAN T-YMPHOTROPIC VIRUS TYPE III (HTLV-III/LAV). ALWAYS HANDLE BLOOD SPECIMENS AS POTENTIAL BIOHAZARDS.

1. Capillary Blood : Collect from a puncture directly into the kapillery™ according to technique described under TEST PROCEDURES. To avoid sampling errors, the blood must be free- flowing and collected with minimum delay.
2. Venous Blood : Collect from venous puncture using single disposable sterile syringe.

Procedure for Staining

1. Fill the kapillery™ tube with above specimen upto black marking (Approx 75 ul) keeping tube nearly horizontal, roll tube between fingers several times to mix blood and anticoagulants. Roll tube between fingers at least 10 times or for at least 5 seconds to mix blood with coating of Acridine Orange. PROCEED IMMEDIATELY TO NEXT STEP.
2. Seal tube using tube plug.
3. Insert tube Suspender into open end of kapillery™ using clean forceps, provided with the kit.
4. Centrifuge immediately after inserting tube suspender in kapillery™
5. Place tube(s) on rotor of micro centrifuge according to specified procedure in operators manual. Centrifuge for 5 minutes at 12000 RPM.

Technology

The key feature of the method is centrifugation and thereby concentration of red blood cells in a predictable area of the tube, making detection easy and fast. Red cells containing plasmodia are less dense than normal ones and concentrates

just below leukocytes at the top of the erythrocyte column. The tube suspender forces all the surrounding cells in 40 micron space between its outside circumference and the inside of the tube. Parasite takes up acridine orange and appears bright speak of light with proper morphology to support among non fluorescing red cells. Virtually all the parasites can be seen by rotating tube, under the fluorescence microscope.

Staining result

DNA rich structures-Fluorescent bright green.
RNA rich structure - Pale green / Orange.
The diagnosis is reported as malarial parasite seen / not seen.

Refer reporting pattern given below

Patient's name :
Investigation requested :

- Malaria ☐ Microfilaria ☐
- Result of Screening : Positive ☐ Negative ☐
- Species of Malaria : Plasmodium falciparum ☐ Plasmodium vivax ☐
- Morphological observation
  Trophozoites ☐ Schizonts ☐ Gametocytes ☐

Parasite Index

- I^+ = 1 to 10 parasites / Microscopic field.
- II^+ = 10 to 50 parasites / Microscopic field.
- III^+ = 50 to 100 parasites / Microscopic field.
- IV^+ = More than 100 parasites / Microscopic field.

CAUTION !

1. **Warning :**
   Acridine Orange reagent may be toxic. Do not ingest. Avoid contact with skin, eyes and clothing.

2. **Storage :**
   Keep Tubes tightly stoppered in their vials when not in use. Remove tubes one by one as needed. Be sure to re-stopper the vial each time. Store tubes in their sealed vial in a dark, dry place at 15^0 C. to 32^0 C. Protect from moisture, direct light and heat.

3. **Stability : (Vial Expiry)**
   Printed date on label applies only to tubes in the unopened vial. Opened vial expiration- tubes can be used for 30 days after first opening the vial. Record the opening date of the vial in the space provided on the label. Do NOT use tubes after 30 days from opening.

4. **Sample Collection**
   All samples must be treated using state of the art technology. All samples must be clearly labled. Suitable instrument must be used for taking samples and for their preparations. Follow the mfg's instructions and there application / use.

5. **Instruction for use**
   In order to avoid errors, staining process must be carried out by qualified personnel. National guideline for work safety and quality assurance must be followed.

6 Diagnosis

Diagnosis must only be made by authorised and trained persons. Valid nomenclatures must be used. Further confirmatory test must be used. Further confirmatory test must be selected and performed according to recognized methods.

7 Protection against Infection

Effective measures must be taken to protect against infection in line with laboratory guidelines. Used reagents that are past there shelf life must be disposed of as special waste according to local guidelines. Florotek Biosystems, or its local supplier does not undertake any responsibility towards accident arising out of handling or use of this kit. The manufacturer disclaims any implied warranty of use and sale for any other purpose.

For In Vitro Diagnosis use only.

Kapillery™

Souillure du kit pour la detection des haemoparasites avec la microscopie de fluorescence.

Creons Ensemble Le Monde Libre De Malaria !!

Florotek Biosystems

Kapillery™

Histoire

La malaria est une maladie transmise par un moustique du genre Anopheles et provoquée par des parasites du genre plasmodium qui infectent alternativement des hôtes humains et des insectes. C'est une très vieille maladie et l'homme préhistorique a vraisemblablement souffert de la malaria. Elle est probablement originaire d'Afrique et a accompagné les migrations humaines sur les rivages méditerranéens, en Inde et jusque dans le Sud-est asiatique. Dans le passé, elle était communément rencontrée dans les zones marécageuses autour de Rome et le nom dérivé de l'Italien est « malaria » ou « mauvais air », également connue sous le nom de fièvre romaine. Aujourd'hui, environ 500 millions de personnes en Afrique, en Inde, dans le Sud-est asiatique et en Amérique du Sud sont exposées à un paludisme endémique qui est à l'origine de deux millions et demi de décès par an, dont un million d'enfants.

Signes cliniques

Les signes cliniques de la malaria incluent fièvre, sensation de froid, douleurs, maux de tête et vomissements.

Dignostic

Le diagnostic précoce et rapide de la malaria est une nécessité, qui gagne en importance au sein des programmes de santé dans les zones endémiques en réponse à l'augmentation croissante du coût des médicaments et à la reconnaissance de l'importance d'un traitement précoce, suffisant et indispensable à la réduction de la

morbidité et de la mortalité du paludisme. La méthode diagnostique la plus courante est l'identification du parasite de malaria dans le sang périphérique. Il n'est pas obligatoire d'attendre l'élévation de la fièvre pour prélever le sang et le tester ; si le paludisme est suspecté, un prélèvement sanguin doit être fait et examiné en urgence. En outre, un test négatif n'exclut pas forcément la présence du paludisme, s'il y a doute clinique, une répétition de l'examen est nécessaire. Des améliorations dans le diagnostic du paludisme doivent faciliter l'identification des sujets infectés et le traitement avec des médicaments appropriés. Le diagnostic traditionnel, basé sur l'examen microscopique des lames de frottis et de goutte épaisse colorées au Giemsa est un travail intense consommant du temps et pouvant donner lieu à des faux résultats en cas de faible parasitémie.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses et nouvelles techniques rapides pour le diagnostic du paludisme ont été développées. Parmi ces techniques, l'examen des parasites basé s la micro centrifugation, la fluorescence et le gradient de densitédes globules rouges infectés a un avantage considérable en termes de rapidité, de facilité, de fiabilité et de sensibilité dans le diagnostic du paludisme. En plus, cette technique est d'une immense aide pour identifier les sujets infectés avec une parasitémie faible. Le kit KAPILLERY ™ s'applique à cette technique.

Principe de la coloration.

Lorsque le parasite malarique est coloré à l'acridine orange, il en résulte une coloration différentielle verte de l'ADN nucléaire et rouge de l'ARN cytoplasmique qui permet l'identification du parasite.

Composition de KAPILLERY®

Le kit Kapillery contient les éléments suivants

Flacons d' acridine orange

Tubes capillaries des tubes

Joints de tube

Embouts

Echantillon Spécimen pour la recherche

Songveineux

Equipement requis

1. Microscope à Fluorescence aves l'objectif 60x.
   Système de filtres recommandés

Filtre d'excitation	:	485-570nm
Miroir bichromatique	:	525-635nm
Filtre de suppression	:	505-600nm

2. Portoir à tubes capillaires
3. Pinces
4. Huile à immersion

Prélèvement d'échantillon

ATTENTION : LES ECHANTILLONS SANGUINS PEUVENT ETRE CONTAMINES PAR LE VIRUS DE L'HEPATITE B OU LE VIRUS HTLV-III/LAV). TOUJOURS MANIPULER LES ECHANTILLONS SANGUINS COMME DES PRODUITS CONTAMINANTS.

1. Sang capillaire : prélever directement le sang dans le tube capillaire selon la technique décrite dans le mode opératoire. Pour éviter es erreurs de prélèvement, le sang doit couler librement et être prélevé rapidement.

2. Sang veineux : prélever à l'aide d'une seringue stérile à usage unique.

Procédure pour la coloration

1. Remplir de sang le tube capillaire jusqu'à la limite du trait noir (approximativement 75μl) en maintenant le tube Presque à l'horizontale, puis rouler le tube plusieurs fois entre les doigts afin de mélanger le sang et l'anticoagulant. Rouler le tube entre les doigts au moins 10 fois ou pendant au moins 5 secondes pour mélanger le sang à d'orange d'acridine fixé dans les parois du tube capillaire. Procéder immédiatement à a prochaine étape.
2. Fermer le tube à l'aide de son bouchon.
3. Insérer un embout à l'extrémité ouverte du capillaire à l'aide de pinces propres fournies dans le kit.
4. Centrifuger immédiatement le tube capillaire.
5. Placer les tubes capillaires sur le rotor de la micro Centrifugeuse. Puis centrifuger pendant 5 minutes à 12 000 T / Minute.

Précaution !

Ne jamais centrifuger un nombre impair des tubes en même temps. Utiliser le tube capillaire vide fermé à la fois avec son joint et un embout pour

Examiner les tubes capillaires centrifugés au microscope à fluorescence en utilisant un portoir adapté.
Ne jamais toucher le tube capillaire centrifugé avec ses doigts à l'interface RBC/WBC.
Ne jamais toucher le tube capillaire centrifugé avec ses doigts à l'interface RBC/WBC.
Les tubes capillaires centrifugés sont stables pendant 4heures, s'ils sont conservés verticalement à l'abri de la Chaleur et de la lumière.

Technologie

La caractéristique principale de la méthode est la centrifugation, et de ce fait, la concentration des globules rouges dans une zone prévisible du tube, rend la détection facile et rapide des parasites. Les hématies parasitées sont moins denses que les normales et sont concentrées juste en dessous des leucocytes et au dessus de la colonne des érythrocytes. L'embout de tube capillaire comprime toutes les cellules environnantes dans un espace d'environ 40 μm entre la circonférence extérieure et l'intérieur du tube. Le parasite prend de l'acridine orange et apparaît brillant de la lumière avec la morphologie appropriée pour soutenir parmi les globules rouges non fluorescents. En pratique, tous les parasites peuvent être observés en examinant le tube capillaire sous le microscope à fluorescence.

Résultats après coloration

Structures riches en ADN : vert brillant fluorescent Structures riches en ARN : vert pâle/orange

Le diagnostic est rapporté en terme de parasite malarique identifié /non identifié.

Se référer au modèle donné ci-dessous :

Nom du patient :

Examens demandés:

- Malaria ☐ Microfilaria
- Résultat: ☐ négatif ☐ positif
- Parasites diagnostiqués
- Plasmodium falciparum
- Plasmodium vivax
- Observation morphologique :
- Trophozoïtes ☐ Schizontes ☐ Gamétocytes

Index de parasitémie :

- I+ = 1 à 10 parasites/champ microscopique
- II+ = 0 à 50 parasites/champ microscopique
- III+ = 50 à 100 parasites/champ microscopique
- IV+ = plus de 100 parasites/champ micoscopique

AVERTISSEMENT ! **ATTENTION !**

1.Précaution d'emploi

L'orange acridine est toxique. Ne pas l'ingérer. Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les vêtements.

2. Conservation :

Garder les tubes capillaires hermétiquement fermés dans leurs flacons en l'absence de tout usage. En cas de nécessité, prélever les tubes capillaires un par un. S'assurer chaque fois que leur flacon est bien fermé. Conserver les capillaires à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité entre 15°C et 32°C.

3. Stabilité :

La date imprimée sur l'étiquette s'applique seulement pour les

boîtes non ouvertes. Expiration : les tubes peuvent être employés jusqu'à 30 jours après la première ouverture de leur boîte. Enregistrer la date d'ouverture de la boîte dans l'espace approprié sur l'étiquette. Ne pas utiliser les tubes 30 jours Après l'ouverture.

4. Prélèvement des échantillons :

Tous les échantillons doivent être traités en utilisant le même mode opératoire. Identifier clairement chaque échantillon. Utiliser les instruments les plus appropriés pour effectuer les prélèvements et leur préparation. Suivre scrupuleusement les instructions et leur application.

5. Instructions d'utilisation :

Afin d'éviter des erreurs, la procédure de coloration doit être effectuée par le personnel qualifié.

Les instructions de sécurité et d'assurance qualité de travail doivent être respectées.

6.Diagnostic

Le diagnostic doit être effectué uniquement par des personnes habilitées et qualifiées. Une nomenclature valide doit être utilisée. Plusieurs tests de confirmation doivent être sélectionnés et réalisés selon des méthodes reconnues

7 .Protection contre les contaminations :

Des mesures efficaces doivent être prises pour se protéger des contaminations en conformité avec les instructions en vigueur dans les laboratoires. Les réactifs périmés doivent être systématiquement jetés dans des conteneurs prévus à cet effet. FLOROTEK BIOSYSTEMS ou son représentant local ne sont pas responsables d'avaries survenant en cas de mauvaise manipulation ou utilisation du kit. Le fabricant décline toute responsabilité en cas d'utilisation et de vente illicite dans n'importe quel autre but.

Usage diagnostique in vitro uniquement.