



MALARIA Ag CELISA

English

Product Code:
KM2/KM2BP

INTENDED USE

The Malaria Ag CELISA™ has been designed as a confirmatory test for *Plasmodium falciparum* (P.f) malaria in situations where traditional diagnosis is unclear, for screening blood transfusion products, or to confirm cases of travel-related infection. It is **not** intended to replace the conventional blood film diagnosis.

INTRODUCTION

Malaria is still one of the most prevalent diseases in the world with a major impact on developing tropical countries. Over 2 billion people live in malarious areas of the world and over 200 million are infected each year. Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*. Four species of the parasite commonly infect man, the most important being *Plasmodium falciparum* which is responsible for approximately 3 million deaths per year.

The Malaria Ag CELISA™ kit is a monoclonal antibody-based assay specific for P.f malaria. The assay detects HRP-2, an antigen produced at the merozoite (red blood cell) stage of the infection. This antigen circulates in the blood for up to 14 days post infection.

Malaria should be considered in the diagnosis of **any** fever of unknown aetiology in persons who have travelled to malarious areas, have recently received whole-blood transfusions or who live or work near airports. There are currently 91 countries and territories with malaria transmission. Acute malaria may be mistaken for tuberculosis, yellow fever, appendicitis, influenza, urinary tract infection or other diseases.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Malaria Ag CELISA™ is a sandwich ELISA where microwells used in the assay are pre-coated with anti-P.f monoclonal antibody (MAb). The addition of a sample in the well allows the binding of anti-P.f MAb and HRP-2 complex if the protein is present in the sample. A wash step removes the unbound components. A second MAb conjugated to enzyme horseradish peroxidase is added as the detector which binds to the complex. The addition of a substrate solution develops the bound complex to a blue colour. Stopping solution is added to terminate the reaction, turning the microwells from blue to a yellow colour in which intensity is proportional to the HRP-2 in the sample.

CONTENTS OF THE KIT

The Malaria Ag CELISA is available in 2 different formats:

		KM2	KM2BP
MAMW	CELISA Plate – 1x96 wells - (single use only)	2 plates	10 plates
CONTROL+	Positive Control	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
CONTROL-	Negative Control	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
MAPO	Enzyme Conjugate (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
MACD	Conjugate Diluent	1 x 24mL	1 x 120mL
MAPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
MASC	Substrate Chromogen (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
MASB	Substrate Buffer	1 x 24mL	1 x 125mL
MASS	Stopping Solution	1 x 12mL	2 x 30mL

Store all components at 2-8°C. Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Malaria positive blood samples, distilled water, micropipettes and tips, clean glassware or plastic containers for solutions, humid chamber, ELISA washer, spectrophotometer to read absorbances at a single wavelength of 450nm, or at dual wavelengths of 450nm and 620nm.

PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only. Reagents should not be used after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix reagents from different kits. Thimerosal preservative added to some components is a poison. Exercise caution when handling these components. The stopping solution is corrosive. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Dispense all reagents with care to avoid cross contamination of wells. Avoid exposure of the substrate to light. Treat all clinical and control material as though potentially infectious and dispose of in accordance with local operating regulations. For further information, please refer to the Safety Data Sheet.

INSTRUCTIONS FOR USE

Preparation of Wash Buffer

If crystals are present, warm the concentrate to dissolve. For each microplate, add 50mL PBS-Tween concentrate **MAPT** to 950mL of distilled water. Label the bottle **WASH BUFFER**. Store at 2-8°C.

Preparation of Samples

Collect patient blood by standard venepuncture procedure using an anticoagulant. Lyse blood by freezing, use the lysed blood as the test specimen **(SAMPLE)**. Serum or plasma may be used as an alternative to whole blood but the use of these samples may result in the loss of sensitivity. The blood should be stored below -10°C if the analysis is delayed.

Positive and Negative Controls

The Negative Control **CONTROL-** is RPMI, add 100µL directly into the well as a negative control, RPMI can also be used to dilute the Positive Control. The Positive Control **CONTROL+** is a culture supernatant containing HRP-2, a known positive blood can also be used as an internal positive control. **IMPORTANT: The kit Positive Control is stable for a maximum of three months at 2-8°C. Keep the Positive Control stored frozen at -20°C to -80°C upon kit arrival.**

Assay Procedure

- Bring all reagents to room temperature (18-25°C) before use.
- Prepare **WASH BUFFER** (see Preparation of Wash Buffer)
- Remove required number of **MAMW** strips. Reseal the foil bag containing unused microwell strips immediately.
- Pipette 100µL of the **(SAMPLE)** Positive Control **(CONTROL+)** or known positive) and Negative Control **(CONTROL-)**, into individual microwells. Include two positive and two negatives in each assay run. Cover and incubate for one (1) hour at room temperature in a humid chamber.

The set of instructions below is for one 8-well strip only. Calculate the required reagent for your test, allowing 1mL per 8-well strip.
- In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength **CONJUGATE**. For each 8-well strip, add 5µL of conjugate concentrate **MAPO** to 995µL of conjugate diluent **MACD** and mix thoroughly.
- Wash the wells 4 times preferably using an automatic plate/strip washer or manually as follows:
- Empty contents from the wells. Refill with the **WASH BUFFER**.
- Repeat this process a further four (4) times. After the fifth wash, tap dry the plate on absorbent tissue.
- NB: take care when flicking out plates, hold side of frame firmly to hold strips in place.
- Add 100µL of **CONJUGATE** to each well. Incubate for one (1) hour at room temperature in a humid chamber.
- In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength **SUBSTRATE**. For each 8-well strip, add 50µL of substrate chromogen **MASC** to 950µL of substrate buffer **MASB** and mix thoroughly. The stability of the solution is 30 minutes.
- Repeat washing as in step 6.
- Add 100µL of fresh **SUBSTRATE** and incubate in the dark (covered) at room temperature for 15 minutes.
- Add 50µL of Stopping Solution **MASS**. Tap the plate to mix.
- Read the results visually or in a spectrophotometer at 450nm, or 450nm/620nm, blanking the machine on air.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

Visually

Observe the colour intensity of the control and specimen wells. The Positive Control should be blue before, and yellow after stopping.

Photometrically

Read the microwell plate at 450nm or 450nm / 620nm in a compatible ELISA plate reader, blanked against air.

For the test results to be accepted the Negative Control must read as follows:

	O.D Value (450nm, 450/620nm)
Negative Control	< 0.1
Positive Control	> 1.5 <i>Positive Control with a concentration of > 10ng/mL</i>
Cut-Off level	= Negative Control OD + 0.1

Negative blood samples should give optical density readings below 0.1 OD units. However, to allow for inter-laboratory variation we strongly recommend that each laboratory run a number of known negative blood samples to allow standardisation of the CELISA positive / negative cut-off level.

All specimens with an absorbance value above the cut-off level should be considered positive for *P. falciparum* antigen. A positive result indicates the presence of *P. falciparum* HRP-2 antigen. This is suggestive of current or very recent infection. The assay has been shown to detect *P. falciparum* infection at parasitaemias as low as 0.001%. The intensity of colour is not proportional to the level of parasitaemia. *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* infections are not detected. Please note that the test may remain positive for several days after parasites are no longer detectable in blood films.

Quantification of HRP-2

This assay can be used to quantify HRP-2 by serially diluting and constructing a standard curve using a well-defined positive control or a recombinant Pf-HRP-2 antigen. The estimated lower detection limit is 200-400 picogram per millilitre (pg/mL).

An improved version of the Malaria Ag CELISA kit was developed specifically for quantification of Pf-HRP-2, the Quantimal™ CELISA Ultra-sensitive Pf-HRP-2 Malaria (Product Code: KM8). The estimated lower detection limit of KM8 is as low as 40 pg/mL. Please contact your distributor or Cellabs for more information on the suitable ELISA kit for your quantification needs.

WASTE DISPOSAL

Dispose of any unused components as biohazardous waste. For more information, please refer to the MSDS.

SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE MALARIA AG CELISA

Refer to summary table at end of insert. All data on the Malaria Ag CELISA can be obtained in the product information sheet. Please ask your local distributor or contact Cellabs.

INDEMNITY NOTICE

Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims. A positive or negative result does not preclude the presence of other underlying causative agents. Cellabs and its agents and distributors shall not be liable for damages under these circumstances.



MALARIA Ag CELISA™

Français

Product Code: KM2/KM2BP

être utilisé comme contrôle positif interne. **IMPORTANT: Le kit Contrôle Positif est stable pendant un maximum de trois mois à 2-8°C. Gardez le contrôle positif conservé congelé entre -20 ° C et -80 ° C à l'arrivée du kit.**

UTILISATION PRÉVUE

Le Malaria Ag CELISA a été conçu comme un test de confirmation du paludisme à Plasmodium falciparum (P.f) dans les situations où le diagnostic traditionnel n'est pas clair, pour le dépistage des transfusions sanguines ou pour confirmer les cas d'infection liée au voyage. Il n'est pas destiné à remplacer le diagnostic conventionnel du film sanguin.

INTRODUCTION

Le paludisme reste l'une des maladies les plus répandues dans le monde, avec un impact majeur sur les pays tropicaux en développement. Plus de 2 milliards de personnes vivent dans des régions impaludées du monde et plus de 200 millions sont infectées chaque année. Le paludisme est causé par des parasites protozoaires du genre Plasmodium. Quatre espèces de parasite infectent fréquemment l'homme, le plus important étant Plasmodium falciparum, responsable d'environ 3 millions de décès par an.

Le kit Malaria Ag CELISA est un anticorps monoclonal spécifique à P.f malaria. Le test détecte HRP-2, un antigène produit au stade mérozoïte (globules rouges) de l'infection. Cet antigène circule dans le sang jusqu'à 14 jours après l'infection.

Le paludisme doit être pris en compte dans le diagnostic de toute fièvre d'étiologie inconnue chez les personnes ayant voyagé dans des zones impaludées, ayant récemment reçu des transfusions de sang total ou vivant ou travaillant à proximité d'aéroports. Il y a actuellement 91 pays et territoires touchés par la transmission du paludisme. Le paludisme aigu peut être confondu avec la tuberculose, la fièvre jaune, l'appendicite, la grippe, l'infection des voies urinaires ou d'autres maladies.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Le Malaria Ag CELISA est un ELISA en sandwich où les micropuits utilisés dans le test sont pré-enrobés d'anticorps monoclonal anti-P.f (anti-PfMAB). L'ajout d'un échantillon dans le puits permet la liaison du complexe anti-P.fMAB et HRP-2 si la protéine est présente dans l'échantillon. Une étape de lavage enlève les composants non liés. Un second MAB conjugué à l'enzyme peroxydase de raifort est ajouté en tant que détecteur qui se lie au complexe. L'ajout d'une solution de substrat développe le complexe lié à une couleur bleue. Une solution d'arrêt est ajoutée pour terminer la réaction, en tournant les micropuits de bleu à une couleur jaune dans laquelle l'intensité est proportionnelle à la HRP-2 dans l'échantillon

COMPOSITION DU COFFRET

La trousse Malaria Ag CELISAP™ est disponible en 3 formats :

		KM2	KM2BP
	Plaques CELISA – 1x96 puits (usage unique)	2 plaques	10 plaques
	Contrôle positif	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
	Contrôle négatif	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
	Conjugué enzymatique (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
	Diluant pour conjugué	1 x 24mL	1 x 120mL
	PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
	Substrat chromogène (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
	Tampon de substrat	1 x 24mL	1 x 125mL
	Solution d'arrêt	1 x 12mL	2 x 30mL

Conserver tous les composants à 2-8°C. Les dates de péremption sont clairement marquées sur chaque composant et sur le coffret de la trousse. L'ouverture n'altère pas les dates de péremption.

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Echantillon sanguin positif pour la malaria; micropipettes et embouts; eau distillée, verrerie propre ou récipients plastiques pour solutions; chambre humide; laveur ELISA ou bouteille de rinçage; Spectrophotomètre à plaques ELISA capable de lire à 450 nm ou à 450/620 nm.

PRECAUTIONS

Produit à usage uniquement *in vitro*. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si l'emballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets différents. Certains réactifs contiennent du Thimerosal comme préservatif, qui est un poison. Manipulez ces réactifs avec soin. La solution d'arrêt est corrosive. Évitez tout contact avec la peau, les yeux ou les membranes muqueuses. Ajouter les réactifs en évitant tout risque de contamination croisée des puits. Éviter d'exposer le substrat à la lumière. Les échantillons cliniques et les contrôles doivent être considérés comme potentiellement infectieux et jetés selon les procédures en vigueur. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

Préparation du tampon de lavage

Si des cristaux apparaissent dans le concentré, réchauffer le réactif pour les dissoudre. Pour chaque plaque de micropuits, ajouter 50mL de concentré PBS/Tween à 950mL d'eau distillée. Libeller la bouteille . Conserver à 2-8°C.

Préparation des échantillons

Collecter l'échantillon patient par ponction veineuse normal, sous anticoagulant. Congeler le sang pour produire un lysat, et utiliser ce lysat comme spécimen à doser . Le sérum ou le plasma peuvent être utilisés au lieu du sang total, mais l'emploi de ces échantillons risque de résulter en une sensibilité amoindrie du dosage. Le sang doit être conservé à -10°C si le dosage est retardé.

Contrôles positifs et négatifs

Le Contrôle Négatif est RPMI, ajouter 100µL directement dans le puits comme un contrôle négatif, RPMI peut également être utilisé pour diluer le contrôle positif. Le contrôle positif est un surnageant de culture contenant HRP-2, un sang positif connu peut également

Mode D'emploi

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant l'emploi.
- Préparer le (voir Préparation du Tampon de Lavage).
- Retirer le nombre requis de micropuits . Immédiatement refermer le sac contenant les micropuits restants avec du ruban adhésif.
- Ajouter 100µL de de contrôle positif (ou échantillon patient positif) et de contrôle négatif () dans chaque micropuits. Inclure deux contrôles positifs et deux contrôles négatifs dans chaque série de dosage. Couvrir et incubé une (1) heure à température ambiante (TA). L'ensemble des instructions ci-dessous est pour une bande de 8 puits seulement. Calculez le réactif requis pour votre test, en laissant 1 ml par bandelette à 8 puits.
- Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de . Ajouter 5µL de conjugué concentré à 995µL de diluant de conjugué et mélanger vigoureusement (prévoir 1 mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits).
- Laver la plaque quatre fois (4x) à l'aide d'une laveuse de plaques automatique ou manuellement comme suit :
 - Vider le contenu des micropuits. Remplir les micropuits de .
 - Répéter l'opération quatre (4) fois. Après la cinquième lavage, rabattre vigoureusement la plaque de micropuits inversée sur une serviette absorbante jusqu'à ce qu'aucun liquide n'en sorte.
 - NB : opérez cette étape avec précaution, en serrant le cadre de la plaque à micropuits pour éviter qu'ils ne s'en délogent.
- Ajouter 100µL de dans chaque puits. Incuber une (1) heure à température ambiante (TA) en chambre humide.
- Dans les 10 dernières minutes de l'incubation, préparer la solution de travail de . Ajouter 50µL de substrat chromogène à 950µL de tampon de substrat et mélanger vigoureusement (prévoir 1mL de solution de travail par barrette de 8 micropuits). Cette solution de travail est stable pendant 30 minutes.
- Répéter le lavage comme à l'étape 6.
- Ajouter 100µL de frais et incubé (couvert) à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.
- Ajouter 50µL de solution d'arrêt . Taper la plaque pour mélanger.
- Lire les résultats visuellement ou au spectrophotomètre à 450 nm ou à 450nm/620 nm, calibré à l'air.

LECTURE, INTERPRETATION DES RESULTATS ET DIAGNOSTIQUE

Lecture visuelle

Observer l'intensité couleur des échantillons et des contrôles. Les contrôles positifs doivent être bleu avant l'étape de solution d'arrêt et jaune après.

Lecture spectrophotométrique

Lire les résultats dans un spectrophotomètre à microplaque ELISA calibré à l'air à 450 nm ou 450 nm/620 nm. Pour être valides, les valeurs de contrôles négatifs doivent être comme suit :

	OD Value (450nm, 450/620nm)
Contrôle négatif	< 0.1
Contrôle Positif	> 1.5
Seuil discriminant (« cut off »)	Contrôle positif avec une concentration de > 10ng / mL D.O. du Contrôle Négatif + 0.1

Les échantillons de sang négatifs doivent donner une densité optique inférieure à 0.1 unités de D.O. Néanmoins, afin de compenser pour les variations inter laboratoires, nous recommandons à chaque laboratoire d'inclure un certain nombre d'échantillons négatifs confirmés afin d'étalonner le seuil discriminant entre positif et négatif.

Tout spécimen avec une absorbance supérieure au seuil discriminant doit être considéré comme positif pour l'antigène de P. falciparum. Un résultat positif indique la présence d'antigène de P. falciparum. Ceci suggère une infection en cours ou très récente. Il a été démontré que le dosage permet de détecter une infection à P. falciparum dans des parasitemies aussi faibles que 0.001%. L'intensité couleur n'est pas proportionnelle au niveau de parasitémie. Les infections à P. vivax, P. ovale et P. malariae ne sont pas détectées. Notez que le test peut demeurer positif plusieurs jours après que le parasites ait disparu des examens à la goutte épaisse.

Quantification HRP-2

Ce test peut être utilisé pour quantifier HRP-2 en diluant en série et en construisant une courbe standard en utilisant un contrôle positif bien défini ou un antigène Pf-HRP-2 recombinant. La limite de détection inférieure estimée est de 200 à 400 picogrammes par millilitre (pg / mL).

Une version améliorée du kit Malaria Ag CELISA a été développée spécialement pour la quantification de Pf-HRP-2, le Quantimal™ CELISA Ultra-sensible Pf-HRP-2 Malaria (Code de produit: KM8). La limite inférieure de détection estimée de KM8 est aussi basse que 40 pg / mL. Veuillez contacter votre distributeur ou Cellabs pour plus d'informations sur le kit ELISA approprié pour vos besoins de quantification.

DECHETS

Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST

Reférez-vous au tableau récapitulatif en fin de notice. Toutes les données sur le test Malaria Ag CELISA sont sur la fiche technique du produit. Contactez Cellabs ou votre distributeur pour l'obtenir.

NOTICE D'INDEMNITE

Toute modification ou variation du protocole d'emploi recommandé peut affecter les performances annoncées du produit. Un résultat positif ou négatif n'exclue pas la présence d'autres agents causatifs sous-jacents. Cellabs et ses agents et distributeurs ne sont légalement responsables d'aucun dommage dans de telles circonstances.



MALARIA Ag CELISA™

Deutsch

Product Code: KM2/KM2BP

VERWENDUNGSZWECK

Der Malaria Ag CELISA wurde als Bestätigungstest für *Plasmodium falciparum* (*P.f*) Malaria in Situationen, in denen die traditionelle Diagnose unklar ist, zum Screening von Bluttransfusionen oder zur Bestätigung von Fällen von Reise-Infektionen entwickelt. Es ist nicht beabsichtigt, die herkömmliche Blutfilm-diagnose zu ersetzen.

EINFÜHRUNG

Malaria ist nach wie vor eine der häufigsten Krankheiten in der Welt mit erheblichen Auswirkungen auf die Entwicklung tropischer Länder. Über 2 Milliarden Menschen leben in Malaria-gebieten und über 200 Millionen Menschen infizieren sich jedes Jahr. Malaria wird durch Protozoenparasiten der Gattung Plasmodium verursacht. Vier Arten des Parasiten infizieren häufig den Menschen, wobei der wichtigste Plasmodium falciparum für etwa 3 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich ist.

Der Malaria Ag CELISA Kit ist ein monoklonaler Antikörper-basierter Test, der spezifisch für *P.f*-Malaria ist. Der Test erkennt HRP-2, ein Antigen, das im Stadium der Merozoiten (rote Blutkörperchen) der Infektion produziert wird. Dieses Antigen zirkuliert im Blut für bis zu 14 Tage nach der Infektion.

Malaria sollte bei der Diagnose von Fieber unbekannter Ätiologie bei Personen in Betracht gezogen werden, die in Malaria-gebiete gereist sind, kürzlich Vollbluttransfusionen erhalten haben oder in der Nähe von Flughäfen leben oder arbeiten. Derzeit gibt es 91 Länder und Gebiete mit Malaria-Übertragung. Akute Malaria kann mit Tuberkulose, Gelbfieber, Blinddarmentzündung, Grippe, Harnwegsinfektion oder anderen Krankheiten verwechselt werden.

PRINZIP DES TESTS

Der Malaria Ag CELISA™ ist ein Sandwich-ELISA, bei dem im Assay verwendete Mikrovertiefungen mit monoklonalen Anti-*P.f*-Antikörpern (MAb) vorbeschichtet sind. Die Zugabe einer Probe in die Vertiefung erlaubt die Bindung von Anti-*P.f*-MAb und HRP-2-Komplex, wenn das Protein in der Probe vorhanden ist. Ein Waschschritt entfernt die ungebundenen Komponenten. Ein zweiter MAb, der mit Enzym-Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, wird als der Detektor hinzugefügt, der an den Komplex bindet. Die Zugabe einer Substratlösung entwickelt den gebundenen Komplex zu einer blauen Farbe. Stopplösung wird hinzugefügt, um die Reaktion zu beenden, wobei die Mikrowells von blau zu einer gelben Farbe werden, deren Intensität proportional zu der HRP-2 in der Probe ist.

PACKUNGSINHALT

Der Malaria Ag CELISA ist in 3 verschiedenen Größen erhältlich:

		KM2	KM2BP
MAMW	Celisa Platte – 1x96 Vertiefungen - (nur zum einmaligen Gebrauch)	2 Platten	10 Platten
CONTROL	Positive Kontrolle	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
CONTROL	Negative Kontrolle	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
MAPO	Enzymkonjugat (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
MACD	Konjugat-Verdünnungsmedium	1 x 24mL	1 x 120mL
MAPT	Waschpuffer PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
MASC	Substrat-Chromogen (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
MASB	Substratpuffer	1 x 24mL	1 x 125mL
MASS	Stopplösung	1 x 12mL	2 x 30mL

Alle Reagenzien sollten bei 2-8°C gelagert werden. Das Verfalldatum ist auf allen Reagenzien und der Verpackung deutlich gekennzeichnet. Das Verfalldatum ändert sich nicht nach dem Öffnen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Patientenserum, Mikropipetten mit Einwegspitzen, feuchte Kammer, saubere Glasbehälter oder Plastikbehälter für Lösungen, dest. Wasser, ELISA-Waschgerät, Spektrophotometer zum Ablesen der OD-Werte bei einzelner Wellenlänge von 450 nm oder bei doppelter Wellenlänge von 450 und 620 nm.

VORKEHRUNGEN

Nur für die *in vitro*. Diagnostik Reagenzien dürfen nicht nach dem Verfalldatum benutzt werden. Falls die Verpackung beschädigt wurde, bitte bei unserem Vertreter Ersatz anfordern. Reagenzien von unterschiedlichen Kits sollten nicht zusammen verwendet werden. Das Thimerosal-Konservierungsmittel, das bei manchen Bestandteilen hinzugefügt wurde, ist giftig. Die Reagenzien sollten daher mit Vorsicht verwendet werden. Die Stopplösung ist ätzend. Kontakt mit der Haut, den Augen und Schleimhäuten vermeiden. Alle Reagenzien sorgfältig pipettieren, um Kreuzkontamination der Mikrotiterplattenvertiefungen zu vermeiden. Das Substrat sollte nicht dem Licht ausgesetzt werden. Alle klinischen und Kontrollmaterialien sollten behandelt werden, als wären sie potentiell infektiös und nach den jeweils laborüblichen Vorschriften entsorgt werden. Für weitere Informationen siehe die Sicherheitsdatenblätter.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Ansetzen des Waschpuffers

Falls sich Kristalle im Konzentrat befinden, sollte es erwärmt werden, bis sich alles gelöst hat. Für je eine Mikrotiterplatte 50mL PBS-Tween Konzentrat **MAPT** verwenden und mit 950mL dest. Wasser mischen. In eine Flasche geben, mit **WASH BUFFER** beschriften und bei 2-8°C lagern.

Probenvorbereitung

Vollblut durch die Standard-Venenpunktionsmethode unter Zusatz von gerinnungshemmendem Mittel gewinnen. Blut durch Einfrieren lysieren, anschließend das Material zum **SAMPLE** Testen verwenden. Als alternatives Material können auch Serum oder Plasma verwendet werden, jedoch können die Ergebnisse im Vergleich zum Vollblut einen Sensitivitätsverlust beinhalten. Bei nicht sofortiger Testung Blut unter -10 °C lagern.

Positive und negative Kontrollen

Die negative Kontrolle ac ist RPMI, füge 100µL; I direkt in die Vertiefung als negative Kontrolle hinzu, RPMI kann auch verwendet werden, um die positive Kontrolle zu verdünnen. Die positive Kontrolle ab ist ein Kulturüberstand, der HRP-2 enthält, ein bekanntes positives Blut kann auch als eine interne positive Kontrolle verwendet werden. **WICHTIG: Der Kit Positive Control ist bei 2-8 ° C maximal drei Monate stabil. Lassen Sie die Positivkontrolle bei Ankunft des Kits bei -20 ° C bis -80 ° C eingefroren.**

Testdurchführung

- Vor Gebrauch, alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.
- WASH BUFFER** vorbereiten (siehe oben).
- Entfernen Sie die erforderliche Anzahl an **MAMW** Streifen. Verschließen Sie den Folienbeutel mit den unbenutzten Mikrotiterstreifen sofort wieder
- 100µL der **SAMPLE** Positivkontrolle **CONTROL** und Negativkontrolle **CONTROL** oder **MACD**, in die einzelnen Vertiefungen pipettieren. Es sollten bei jedem Testansatz je 2 Kontrollen verwendet werden. Anschließend die Streifen abdecken und in der feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- In den letzten 10 Minuten der Inkubationszeit das **CONJUGATE** vorbereiten. 5µL des Konjugat-Konzentrat **MAPO** zu 995µL des Konjugat-Verdünnungsmediums **MACD** geben und gut mischen (pro Streifen mit 8 Vertiefungen 1mL Lösung herstellen).
- Die Streifen bevorzugt mit einem Waschautomaten waschen (4x), ansonsten per Hand:
 - Den Inhalt der Vertiefungen ausleeren und **WASH BUFFER** hinzugeben.
 - Das Ganze 4 mal wiederholen. Nach dem fünften Mal restliche Tropfen durch Klopfen der umgekehrten Platte auf einem Papierhandtuch entfernen. Vorsicht !!! Streifen können aus der Halterung herausfallen.
- 100µL **CONJUGATE** in jede Vertiefung pipettieren Anschließend die Streifen abdecken und in der feuchten Kammer für 1 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- In den letzten 10 Minuten der Inkubationszeit das **SUBSTRATE** vorbereiten. 50µL des Substrat-Chromogens **MASC** zu 950µL des Substratpuffers **MASB** geben und gut mischen. (pro Streifen mit 8 Vertiefungen 1mL Lösung herstellen). Die Lösung ist bis zu 30 Minuten stabil.
- Waschschritte wie unter Punkt 6.
- 100µL **SUBSTRATE** in jede Vertiefung pipettieren, dann im Dunkeln zugedeckt 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren .
- 50µL Stopplösung **MASB** in jede Vertiefung pipettieren, Platte vorsichtig bewegen, so dass sich die Lösungen vermischen.
- Die Ergebnisse entweder mit dem Auge ablesen oder mit dem Spektrophotometer bei 450nm, oder 450nm/620nm, Nullwert gegen Luft abgleichen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Visuel

Die Farbindensitäten der Kontrollen und Patienten begutachten. Die Positivkontrolle sollte erst blau sein und nach Zugabe der Stopplösung zu Gelb wechseln.

Photometrisch

OD-Werte in den Mikrotitervertiefungen bei 450nm oder 450nm / 620nm mit einem geeigneten ELISA Meßgerät ablesen, Nullwert gegen Luft abgleichen.

Für valide Meßergebnisse muß die Negativkontrolle wie folgt aussehen:

	O.D Value (450nm, 450/620nm)
Negativkontrolle	< 0.1
Positivkontrolle	> 1.5
Cut-Off level	= OD Negativkontrolle + 0.1

Negative Blutproben sollten einen Meßwert OD <0.1 haben. Unter Berücksichtigung der Inter-Laborvarianz empfehlen wir jedoch, daß jedes Labor einige bekannte negative Blutproben mißt um eine laborinterne Standardisierung des CELISA positiven/negativen Cut-off -Levels zu erhalten.

Alle Proben, die einen höheren Meßwert, als der Cut-off, haben, sollten als *P. falciparum* Antigen-positive Proben betrachtet werden. Ein positives Ergebnis deutet auf eine aktuelle oder erst kürzlich erfolgte Infektion hin. Die Testgenauigkeit hat gezeigt, dass *P. falciparum* Infektionen bei Parasitaemien, mit einer Empfindlichkeit bis zu 0.001% entdeckt werden. Die Intensität der Farbe ist nicht proportional zu der Menge der Parasitaemien. *P. vivax*, *P. ovale* und *P. malariae* Infektionen werden mit diesem Test nicht nachgewiesen. Es ist zu beachten, daß der Test auch noch einige Tage später positiv sein kann, obwohl man unter dem Mikroskop keine Parasiten mehr entdecken kann.

Quantifizierung von HRP-2

Dieser Assay kann verwendet werden, um HRP-2 durch serielle Verdünnung und Konstruktion einer Standardkurve unter Verwendung einer gut definierten positiven Kontrolle oder eines rekombinanten Pf-HRP-2-Antigens zu quantifizieren. Die geschätzte untere Nachweisgrenze beträgt 200-400 Picogramm pro Milliliter (pg / ml).

Eine verbesserte Version des Malaria Ag CELISA-Kits wurde speziell für die Quantifizierung von Pf-HRP-2, dem Quantimal™ CELISA Ultra-sensitiven Pf-HRP-2 Malaria (Produktcode: KM8), entwickelt. Die geschätzte untere Nachweisgrenze von KM8 ist so niedrig wie 40 pg / ml. Bitte kontaktieren Sie Ihren Distributor oder Cellabs für weitere Informationen über das geeignete ELISA-Kit für Ihren Quantifizierungsbedarf.

ENTSORGUNG

Alle nicht benötigten Komponenten müssen als biogefährdender Müll entsorgt werden. Für weitere Informationen, siehe Sicherheitsdatenblätter (MSDS).

SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND ANDERE DATEN ZU DEM MALARIA AG CELISA

Siehe zusammenfassende Tabelle am Ende dieser Anleitung. Alle Daten zu dem Malaria Ag CELISA können aus der Produktinformation entnommen werden. Bitte fragen sie ihren Vertreter oder kontaktieren sie Cellabs.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Änderungen oder Modifikationen der empfohlenen Durchführung können die gemachten oder gefolgerten Angaben beeinflussen. Ein positives oder negatives Ergebnis schließt nicht andere zugrunde- liegende Krankheiten aus. Cellabs und seine Vertreter sind für Folgen derartiger Konstellation nicht haftbar.



MALARIA Ag CELISA™

Italiano

Product Code: KM2/KM2BP

USO PREVISTO

Malaria Ag CELISA è stato progettato come test di conferma per la malaria *Plasmodium falciparum* (P.f) in situazioni in cui la diagnosi tradizionale non è chiara, per lo screening di prodotti trasfusionali o per confermare casi di infezione correlata al viaggio. Non è inteso per sostituire la diagnosi convenzionale del film del sangue.

INTRODUZIONE

La malaria è ancora una delle malattie più diffuse al mondo con un forte impatto sullo sviluppo dei paesi tropicali. Oltre 2 miliardi di persone vivono in aree malariche del mondo e oltre 200 milioni sono infetti ogni anno. La malaria è causata da parassiti protozoi del genere Plasmodium. Quattro specie del parassita comunemente infettano l'uomo, il più importante è il P.f che è responsabile di circa 3 milioni di morti all'anno.

Il kit Malaria Ag CELISA è un test monoclonale a base di anticorpi specifico per la malaria da P.f. Il dosaggio rileva l'HRP-2, un antigene prodotto nello stadio di merozoite (globuli rossi) dell'infezione. Questo antigene circola nel sangue fino a 14 giorni dopo l'infezione.

La malaria deve essere considerata nella diagnosi di qualsiasi febbre di eziologia sconosciuta in persone che hanno viaggiato in aree malariche, che hanno recentemente ricevuto trasfusioni di sangue intero o che vivono o lavorano nei pressi degli aeroporti. Ci sono attualmente 91 paesi e territori con trasmissione della malaria. La malaria acuta può essere confusa con tubercolosi, febbre gialla, appendicite, influenza, infezione del tratto urinario o altre malattie.

PRINCIPIO DEL TEST

La Malaria Ag CELISA è un ELISA a sandwich in cui i micropozzetti utilizzati nel dosaggio sono pre-rivestiti con anticorpo monoclonale anti-P.f (MAb). L'aggiunta di un campione nel pozzetto consente il legame del complesso anti-P.f MAb e HRP-2 se la proteina è presente nel campione. Una fase di lavaggio rimuove i componenti non legati. Un secondo MAb coniugato con enzima perossidasi di rafano viene aggiunto come rivelatore che si lega al complesso. L'aggiunta di una soluzione di substrato sviluppa il complesso associato a un colore blu. La soluzione di arresto viene aggiunta per terminare la reazione, trasformando i micropozzetti da blu a un colore giallo in cui l'intensità è proporzionale all'HRP-2 nel campione.

CONTENUTO DEL KIT

Il kit Malaria Ag CELISA è disponibile in 3 diversi formati:

		KM2	KM2BP
MAMW	Celisa Plate – 1x96 pozzetti - (solo uso singolo)	2 piastre	10 piastre
CONTROL	Controllo Positivo	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
CONTROL	Controllo Negativo	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
MAPC	Enzima Coniugato (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
MACD	Diluente Coniugato	1 x 24mL	1 x 120mL
MAPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
MASC	Substrato Cromogeno (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
MASE	Tampone Substrato	1 x 24mL	1 x 125mL
MASS	Soluzione Bloccante	1 x 12mL	2 x 30mL

Conservare tutti i componenti a 2-8°C. Le date di scadenza sono chiaramente marcate su ogni componente del kit e sulla confezione. Le date di scadenza non cambiano una volta aperte le confezioni.

MATERIALE RICHiesto MA NON FORNITO

Campioni di sangue positivi, acqua distillata, micropipette e puntali, contenitori puliti di vetro o plastica per le soluzioni, camera umida, lavatore ELISA, spettrofotometro in grado di leggere l'assorbanza alla singola lunghezza d'onda di 450nm, o alla doppia lunghezza d'onda di 450nm e 620nm.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico *in vitro*. Non usare dopo la data di scadenza mostrata sull'etichetta. Se l'imballo protettivo è danneggiato, contattare il distributore di zona e chiedere una sostituzione. Non mischiare i componenti provenienti da kit diversi. Il Thimerosal aggiunto come conservante ad alcuni componenti è velenoso. Prestare attenzione quando si maneggiano questi componenti. La soluzione bloccante è corrosiva. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le membrane mucose. Distribuire tutti i reagenti con attenzione per evitare contaminazioni crociate dei pozzetti. Evitare di esporre il substrato alla luce. Si raccomanda di maneggiare tutto il materiale clinico e di controllo come potenzialmente infettivo e di eliminarlo in accordo alla regolamentazione locale. Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza del prodotto (MSDS).

ISTRUZIONI PER L'USO

Preparazione del tampone di lavaggio

Se sono presenti cristalli, scaldare il concentrato per discioglierli. Per ciascuna micropiastre, aggiungere 50mL di PBS-Tween concentrato **MAPT** a 950mL di acqua distillata. Etichettare il flacone **WASH BUFFER**. Conservare a 2-8°C.

Preparazione del campione

Raccogliere il sangue del paziente mediante prelievo venoso standard, usando un anticoagulante. Lisare il sangue per congelamento, usare il sangue lisato come campione (**SAMPLE**). In alternativa possono essere usati il siero o il plasma, sebbene questo possa causare una perdita di sensibilità. Se l'analisi viene eseguita in ritardo, il sangue deve essere conservato al di sotto dei -10°C.

Controlli positivi e negativi

Il controllo negativo ac è RPMI, aggiungere 100µL direttamente nel pozzetto come controllo negativo, l'RPMI può anche essere usato per diluire il controllo positivo. Il controllo positivo ab è un supernatante di coltura contenente HRP-2, un sangue noto può anche essere usato come controllo positivo interno. **IMPORTANTE: il kit Positive Control è stabile per un massimo di tre mesi a 2-8°C. Tenere il controllo positivo memorizzato congelato a -20 oC-80oC all'arrivo del kit.**

Procedura del Saggio

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso.
- Preparare **WASH BUFFER** (vedere Preparazione del tampone di lavaggio)
- Rimuovere il numero richiesto di strisce **MAMW**. Risigillare immediatamente la busta contenente le strisce di micropozzetti non utilizzate.
- Pipettare 100µL del **SAMPLE**, controllo positivo (**CONTROL**) o positivo noto) e controllo negativo (**CONTROL** o **MACD**), in ciascun pozzetto. Includere due positivi e due negativi in ciascuna seduta analitica. Coprire ed incubare per un (1) ora a temperature ambiente in camera umida.
- Durante i primi 10 minuti di incubazione, preparare la soluzione di lavoro di **CONJUGATE**. Aggiungere 5µL di coniugato concentrato **MAPC** a 995µL di diluente del coniugato **MACD** e mescolare con attenzione (usare 1mL per strip da 8 pozzetti).
- Lavare (4x) i pozzetti usando preferibilmente un lavatore automatico di piastre/strisce o manualmente come segue:
 - Svuotare i pozzetti. Riempire con **WASH BUFFER**.
 - Ripetere questa procedura per altre quattro (4) volte. Dopo il quinto lavaggio, battere la piastra rovesciata su tessuto assorbente.
 - Nota: fare attenzione durante l'operazione a mantenere saldamente il supporto della piastra, per tenere le strisce in posizione.
- Aggiungere 100µL di **CONJUGATE** a ciascun pozzetto. Incubare per un (1) ora a temperatura ambiente in camera umida.
- Durante gli ultimi 10 minuti di incubazione, preparare la soluzione di lavoro **SUBSTRATE**. Aggiungere 50µL di substrato cromogeno **MASC** a 950µL di tampone del substrato **MASE** e mescolare con attenzione (usare 1mL per strip da 8 pozzetti). La stabilità della soluzione è di 30 minuti.
- Ripetere i lavaggi del passaggio 6.
- Aggiungere 100µL di substrato fresco **SUBSTRATE** e incubare al buio (coprire) a temperatura ambiente per 15 minuti.
- Aggiungere 50µL di Soluzione Bloccante **MASS**. Picchiettare la piastra per mescolare.
- Leggere il risultato visualmente o con lo spettrofotometro a 450nm, o a 450nm/620nm, usando l'aria come bianco.

LETTURA INTERPRETAZIONE E DIAGNOSI

Visivamente

Osservare l'intensità del colore nei pozzetti di controllo e dei campioni. Il Controllo Positivo deve essere blu prima dell'aggiunta della soluzione di bloccaggio e giallo dopo l'aggiunta.

Fotometricamente

Leggere i micropozzetti a 450nm o a 450nm / 620nm in un lettore di piastra ELISA, usando l'aria come bianco.

Per accettare i risultati il Controllo Negativo deve fornire i seguenti risultati:

	Valori D.O.(450nm, 450/620nm)
Controllo Negativo	< 0.1
Controllo Positivo	> 1.5
	Controllo positivo con una concentrazione di > 10 ng / mL
Livello Cut-Off	= D.O. Controllo Negativo + 0.1

I campioni di sangue negativi, devono fornire letture di densità ottica inferiori a 0,1 unità di DO. Tuttavia, per tenere conto delle variabilità inter – laboratorio è fortemente raccomandato, che ciascun laboratorio esegua un certo numero di campioni negativi noti per standardizzare il livello di cut-off positivo / negativo del kit CELISA.

Tutti i campioni con un valore di assorbanza superiore al livello di cut-off, devono essere considerati positivi per l'antigene *P. falciparum*. Un risultato positivo indica la presenza dell'antigene *P. falciparum*. Questo risultato suggerisce un'infezione in corso o molto recente. Il test ha dimostrato di rilevare l'infezione da *P.falciparum*, in parassitemie dello 0,001%. L'intensità del colore non è proporzionale al livello di parassitemia. Le infezioni sostenute da *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* non sono rilevate dal kit. Tenere presente, inoltre, che il test può rimanere positivo per molti giorni anche dopo che il parassita non è più rilevabile negli strisci di sangue.

Quantificazione di HRP-2

Questo test può essere utilizzato per quantificare HRP-2 diluendo in serie e costruendo una curva standard utilizzando un controllo positivo ben definito o un antigene Pf-HRP-2 ricombinante. Il limite di rilevamento inferiore stimato è 200-400 picogrammi per millilitro (pg / mL).

Una versione migliorata del kit Malaria Ag CELISA è stata sviluppata specificamente per la quantificazione della Pf-HRP-2, la malaria Quantal™ CELISA Ultra-sensibile Pf-HRP-2 (codice prodotto: KM8). Il limite di rilevamento inferiore stimato di KM8 è pari a 40 pg / mL. Si prega di contattare il proprio distributore o Cellab per ulteriori informazioni sul kit ELISA adatto alle proprie esigenze di quantificazione.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

Eliminare qualsiasi componente non utilizzato come rifiuto potenzialmente infettivo. Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ ED ALTRI DATI SU MALARIA Ag CELISA

Fare riferimento alle tabelle riassuntive alla fine del foglio istruzioni. Tutti i dati su Malaria Ag CELISA sono disponibili sul foglio di istruzioni che è possibile richiedere al distributore di zona o contattando Cellabs.

AVVERTENZE SULL'INDENNIZZO

Modifiche o cambiamenti apportati alla procedura raccomandata possono modificare lo stato o causare reclami. Un risultato positivo o negativo non preclude la presenza di altri importanti agenti eziologici. Cellabs ed i suoi distributori non sono legalmente responsabili dei danni nel caso di tali circostanze.



MALARIA Ag CELISA™

Español

Product Code: KM2/KM2BP

USO PREVISTO

El Malaria Ag CELISA se ha diseñado como una prueba confirmatoria para la malaria por *Plasmodium falciparum* (*P.f*) en situaciones donde el diagnóstico tradicional no está claro, para examinar productos de transfusión de sangre o para confirmar casos de infección relacionada con el viaje. No pretende reemplazar el diagnóstico convencional de la película sanguínea.

INTRODUCCIÓN

La malaria sigue siendo una de las enfermedades más prevalentes en el mundo con un gran impacto en el desarrollo de los países tropicales. Más de 2 mil millones de personas viven en áreas maláricas del mundo y más de 200 millones se infectan cada año. La malaria es causada por parásitos protozoarios del género Plasmodium. Cuatro especies del parásito comúnmente infectan al hombre, la más importante es *P.f*, que es responsable de aproximadamente 3 millones de muertes por año.

El kit Malaria Ag CELISA es un ensayo basado en anticuerpos monoclonales específico para *P.f* malaria. El ensayo detecta HRP-2, un antígeno producido en el estadio merozoito (glóbulos rojos) de la infección. Este antígeno circula en la sangre durante hasta 14 días después de la infección.

La malaria debe ser considerada en el diagnóstico de fiebre de etiología desconocida en personas que han viajado a áreas maláricas, que han recibido transfusiones de sangre completa recientemente o que viven o trabajan cerca de aeropuertos. Actualmente hay 91 países y territorios con transmisión de malaria. La malaria aguda puede confundirse con tuberculosis, fiebre amarilla, apendicitis, influenza, infección del tracto urinario u otras enfermedades.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El Malaria Ag CELISA es un ELISA tipo sándwich en el que los micropocillos utilizados en el ensayo se recubren previamente con anticuerpo monoclonal anti-*P.f* (MAb). La adición de una muestra en el pocillo permite la unión del complejo anti-*P.f* MAb y HRP-2 si la proteína está presente en la muestra. Un paso de lavado elimina los componentes no unidos. Se añade un segundo MAb conjugado con enzima peroxidasa de rábano picante como detector que se une al complejo. La adición de una solución de sustrato desarrolla el complejo unido a un color azul. La solución de detención se agrega para terminar la reacción, convirtiendo los micropocillos de azul a un color amarillo en el que la intensidad es proporcional a la HRP-2 en la muestra.

CONTENIDO DEL KIT

El Malaria Ag CELISA está disponible en 3 formatos diferentes

		KM2	KM2BP
MAMW	Placa Celisa –1 x 96 pocillos (un único uso)	2 placas	10 placas
CONTROL	Control Positivo	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
CONTROL	Control Negativo	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
MAPO	Conjugado del enzima (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
MACD	Diluyente del conjugado	1 x 24mL	1 x 120mL
MAPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
MASC	Cromógeno del Sustrato (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
MASB	Solución de sustrato	1 x 24mL	1 x 125mL
MASS	Solución de parada	1 x 12mL	2 x 30mL

Almacenar todos los componentes a 2-8°C. Las fechas de caducidad están indicadas específicamente en cada uno de los componentes del kit y en el envase externo del mismo. Las fechas de caducidad no cambian tras la apertura de los viales

MATERIALES REQUERIDOS QUE NO SE PROPORCIONAN

Muestras de sangre positivas para la malaria, agua destilada, micropipetas y puntas, limpias de vidrio o plástico para las soluciones recipientes, cámara húmeda, lavador de ELISA, Espectrofotómetro para leer absorbancias a una única longitud de onda única de 450nm, o a longitudes de onda duales de 450nm y 620nm, agua destilada.

PRECAUCIONES

Para utilización exclusiva en el diagnóstico in vitro. No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Si se observase que el envase exterior está dañado, contactar con su distribuidor local y solicitar un kit nuevo. El conservante timerosal añadido a algunos componentes es un veneno. La manipulación de estos componentes debe realizarse con precaución. La solución de parada es corrosiva. Evitar el contacto con la piel, ojos y mucosas. Añadir todos los reactivos con cuidado para evitar la contaminación cruzada entre unos pocillos y otros. Evitar exponer el sustrato a la luz. Tratar todas las muestras clínicas y los controles como material potencialmente infeccioso y eliminar de acuerdo con la normativa local. Para más información al respecto, consultar la ficha de seguridad (FDS).

INSTRUCCIONES DE USO

Preparación de la solución de lavado

Si se observa cristalización en el concentrado, disolver por calentamiento. Para cada microplaca añadir 50mL de PBS-Tween 20 concentrado **MAPT** a 950mL de agua destilada. Etiquetar el frasco como **WASH BUFFER** y almacenar de 2 a 8°C.

Preparación de las Muestras

Recoger la muestra de sangre del paciente por el procedimiento estándar de venopunción empleando un anticoagulante. Lisar la sangre congelándola y usar la sangre lisada como muestra para el ensayo. Puede emplearse suero o plasma como alternativa a la sangre

completa, pero el uso de estas muestras puede tener como resultado una pérdida de sensibilidad. Hay que almacenar la sangre a menos de -10°C si no se realiza el análisis de inmediato.

Controles positivos y negativos

El control negativo ac es RPMI, agrega 100µL directamente en el pozo como control negativo, RPMI también se puede usar para diluir el control positivo. El control positivo ab es un sobrenadante de cultivo que contiene HRP-2, una sangre positiva conocida también se puede usar como un control positivo interno. **IMPORTANTE: El kit de control positivo es estable durante un máximo de tres meses a 2-8 ° C. Mantenga el control positivo almacenado congelado a -20 ° C a -80 ° C al llegar el kit.**

Procedimiento del ensayo

- Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (de 18 a 25°C) antes de su uso.
- Preparar la solución de lavado **WASH BUFFER** (ver preparación de solución de lavado)
- Eliminar el número requerido de tiras MAMW. Vuelva a sellar la bolsa de aluminio que contiene tiras de micropocillos sin usar inmediatamente
- Pipetear 100µL de la muestra **SAMPLE**, el control positivo (**CONTROL**) o muestra conocida positiva) y control negativo (**CONTROL** o **MACD**), a sus micropocillos individuales. Incluir dos controles positivos y dos controles negativos en cada fase del ensayo. Tapar e incubar durante una (1) hora a temperatura ambiente (TA) en una cámara húmeda.
- En los últimos 10 minutos del periodo de incubación, preparar el **CONJUGATE** a la dilución de trabajo. Añadir 5µL de conjugado concentrado **MAPO** a 995µL de diluyente de conjugado **MACD** y mezclar completamente (preparar 1mL para cada tira de 8 pocillos).
- Lavar (4x) los pocillos, preferentemente con un lavador de placas automático, o bien de forma manual como sigue:
 - Vaciar el contenido de los pocillos. Rellenar con **WASH BUFFER**
 - Repetir este proceso otras cuatro (4) veces. Sacudir para eliminar los contenidos de los pocillos al final del último lavado
 - NB: Al voltear las placas: tener la precaución de sujetar firmemente el lado del soporte para mantener las tiras en su lugar.
- Añadir 100µL de **CONJUGATE** a cada pocillo. Incubar durante una (1) hora a temperatura ambiente (TA) en una cámara húmeda.
- En los últimos 10 minutos del periodo de incubación, preparar el **SUBSTRATE** a la dilución de trabajo. Añadir 50µL de cromógeno de sustrato **MASC** a 950µL de solución de sustrato **MASB** y mezclar bien (preparar 1mL para cada tira de 8 pocillos). La estabilidad de la solución es de 30 minutos.
- Repetir lavado como en el paso 6.
- Añadir 100µL de **SUBSTRATE** fresco e incubar en la oscuridad (tapado) a t° ambiente durante 15 minutos.
- Añadir 50µL de solución de parada **MASS**. Golpear suavemente la placa para mezclar.
- Leer los resultados de forma visual o con un espectrofotómetro a 450nm, o 450nm/620nm, calibrando el instrumento utilizando como blanco un pocillo vacío.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y DIAGNOSTICO

Visualmente

Observar la intensidad del color de los pocillos de control y de la muestra. El control positivo debería ser azul antes y amarillo después de parar la reacción.

Por fotometría

Leer la microplaca a 450nm o 450nm / 620nm en un lector compatible con placas de ELISA, calibrado con un pocillo vacío como blanco.

Para aceptar los resultados del test, el control negativo tiene que mostrar los siguientes valores:

	Valor O.D (450nm, 450/620nm)
Control negativo	< 0.1
Control Positivo	> 1.5
	Control positivo con una concentración de > 10 ng / ml
nivel Cut-Off	= OD control negativo + 0.1

Las muestras de sangre negativas deberían dar una densidad óptica por debajo de 0.1 unidades OD. Sin embargo, para dar un margen a la variación entre distintos laboratorios creemos muy aconsejable que cada laboratorio realice el ensayo de muestras de sangre negativas conocidas que permita la estandarización del valor cut-off positivo/negativo para el CELISA.

Todas las muestras con un valor de absorbancia por encima del valor del cut off tienen que considerarse como positivas para el antígeno del *P. falciparum*. Un resultado positivo indica la presencia del antígeno del *P. falciparum*. Esto sugiere una infección actual o muy reciente. Se ha demostrado que este ensayo detecta la infección por *P. falciparum* en parasitemias tan pequeñas como del 0.001%. La intensidad del color no es proporcional al nivel de parasitemia. El test no detecta las infecciones por *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*. Debe tenerse en cuenta que el test puede seguir dando resultado positivo durante varios días aun después de que los parásitos ya no sean detectables en los ensayos clásicos en sangre.

Cuantificación de HRP-2

Este ensayo se puede usar para cuantificar HRP-2 diluyendo y construyendo en serie una curva estándar usando un control positivo bien definido o un antígeno Pf-HRP-2 recombinante. El límite de detección inferior estimado es de 200-400 picogramos por mililitro (pg / ml).

Una versión mejorada del kit Malaria Ag CELISA fue desarrollada específicamente para la cuantificación de Pf-HRP-2, el Quantial™ CELISA Ultra-sensitivo Pf-HRP-2 Malaria (Código del producto: KM8). El límite de detección inferior estimado de KM8 es tan bajo como 40 pg / ml. Póngase en contacto con su distribuidor o Cellabs para obtener más información sobre el kit de ELISA adecuado para sus necesidades de cuantificación.

ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS

Los componentes sin usar deben eliminarse como material de riesgo biológico. Para más información, consultar la ficha de seguridad FDS.

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, Y OTROS DATOS DEL THE MALARIA AG CELISA

Consultar la tabla resumen al final de este manual de instrucciones. Todos los datos del Malaria Ag CELISA pueden obtenerse en la ficha técnica del producto. Para más información, consultar con su distribuidor local o contactar con Cellabs.

INFORMACION SOBRE POSIBLES INDEMNIZACIONES

Las modificaciones o cambios realizados sobre el procedimiento recomendado pueden afectar a las posibles reclamaciones tanto directa como indirectamente. Un resultado positivo o negativo no excluye la presencia de otros agentes etiológicos subyacentes. Ni Cellabs ni sus agentes o distribuidores serán legalmente responsables por daños producidos bajo estas circunstancias.



MALARIA Ag CELISA

Portuguese
Product Code: KM2/KM2BP

USO PREVISTO

O Malaria Ag CELISA foi concebido como um teste de confirmação para a malária de *Plasmodium falciparum* (*P.f*) em situações em que o diagnóstico tradicional não é claro, para rastrear produtos de transfusão de sangue ou para confirmar casos de infecção relacionada a viagens. Não se destina a substituir o diagnóstico de filme sanguíneo convencional.

INTRODUÇÃO

A malária ainda é uma das doenças mais prevalentes do mundo com um grande impacto no desenvolvimento de países tropicais. Mais de 2 bilhões de pessoas vivem em áreas maláricas do mundo e mais de 200 milhões são infectados a cada ano. A malária é causada por parasitas protozoários do gênero *Plasmodium*. Quatro espécies do parasita comumente infectam o homem, sendo o mais importante o *P.f*, responsável por aproximadamente 3 milhões de mortes por ano.

O kit Malaria Ag CELISA é um ensaio baseado em anticorpos monoclonais específico para *P.f* malária. O ensaio detecta HRP-2, um antígeno produzido na fase de merozoíto (glóbulos vermelhos) da infecção. Este antígeno circula no sangue por até 14 dias após a infecção.

A malária deve ser considerada no diagnóstico de febre de etiologia desconhecida em pessoas que viajaram para áreas maláricas, receberam recentemente transfusões de sangue total ou que vivem ou trabalham perto de aeroportos. Atualmente, existem 91 países e territórios com transmissão da malária. A malária aguda pode ser confundida com tuberculose, febre amarela, apendicite, influenza, infecção do trato urinário ou outras doenças.

PRINCÍPIO DO TESTE

O Malaria Ag CELISA é um ELISA em sanduíche onde os micropoços utilizados no ensaio são pré-revestidos com anticorpo monoclonal anti-*P.f* (MAb). A adição de uma amostra no poço permite a ligação do MAb anti-*P.f* e do complexo HRP-2 se a proteína estiver presente na amostra. Um passo de lavagem remove os componentes não ligados. Um segundo MAb conjugado com enzima peroxidase de rábano é adicionado como o detector que se liga ao complexo. A adição de uma solução de substrato desenvolve o complexo ligado a uma cor azul. A solução de parada é adicionada para terminar a reação, transformando os micropoços de azul para uma cor amarela, na qual a intensidade é proporcional ao HRP-2 na amostra.

CONTEÚDO DO KIT

O kit Malaria Ag CELISA está disponível em 3 formatos:

		KM2	KM2BP
MAMW	Placas Celisa– 1x96 poços - (para uma utilização)	2 Placas	10 Placas
CONTROL +	Controlo Positivo	1 x 0.5mL	1 x 1.0mL
CONTROL -	Controlo Negativo	1 x 2.5mL	1 x 5.0mL
MAPO	Conjugado Enzimático (200x)	1 x 0.12mL	1 x 0.7mL
MACD	Diluyente do Conjugado	1 x 24mL	1 x 120mL
MAPT	Tampão PBS/Tween (20x)	1 x 125mL	2 x 250mL
MASC	Substrato Cromogénio (TMB) (20x)	1 x 1.2mL	1 x 7mL
MASB	Tampão Substrato	1 x 24mL	1 x 125mL
MASS	Solução de Paragem	1 x 12mL	2 x 30mL

Conservar a 2-8°C. As datas de validade estão referidas em cada componente do kit e na embalagem. Os prazos de validade não se alteram com a abertura dos componentes.

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Amostras de sangue positivas para malária, água destilada, micropipetas com pontas descartáveis, recipientes para as soluções, câmara húmida, Lavador ELISA, Espectrofotómetro capaz de ler absorvâncias, a 450 nm ou 450/620 nm.

PRECAUÇÕES

Apenas para diagnóstico *in vitro*. Não utilizar após ter terminado o prazo de validade. Se a embalagem estiver danificada, contactar o representante local e pedir a substituição por uma nova. Não misturar componentes de kits diferentes. O conservante de Timersal, adicionado a determinados componentes, é tóxico. Cuidado ao manusear estes componentes. A solução de paragem é corrosiva. Evitar o contacto com a pele, olhos e mucosas. Pipetar os reagentes com cuidado para evitar contaminação dos poços. Evitar exposição do substrato à luz. Todo o material analítico e de controlo deve ser tratado como potencialmente infeccioso e deverá ser descartado segundo as normas em vigor. Consultar a ficha de segurança do produto (MSDS) para mais informações.

INSTRUÇÕES DE USO

Preparação do Tampão de Lavagem

Se surgirem cristais nas soluções concentradas, aquecer para dissolvê-los. Por cada microplaca adicionar 50mL de PBS-Tween concentrado **MAPT** a 950mL de água destilada. Colocar rótulo **WASH BUFFER** para identificar o frasco e conservar a 2-8°C.

Preparação das Amostras

Colher as amostras através de venipunctura com a utilização de um **anti-coagulante**. Provocar a lise do sangue através do seu congelamento, utilizar o sangue como amostra depois de efectuada a lise (**SAMPLE**). Podem ser utilizadas amostras de soro ou plasma, em alternativa ao sangue total. Contudo, a utilização destas amostras poderá provocar a perda de sensibilidade. O sangue deve ser conservado abaixo dos -10°C caso haja um atraso na execução da análise.

Controles positivos e negativos

O controle negativo ac é RPMI, adicione 100µL diretamente no poço como um controle negativo, o RPMI também pode ser usado para diluir o Controle Positivo. O Positivo Control ab é um sobrenadante de cultura que contém HRP-2, um sangue positivo conhecido também pode ser usado como um controle positivo interno. **IMPORTANTE: o kit Controle Positivo é estável por um máximo de três meses a 2-8°C. Mantenha o controle positivo armazenado congelado a -20°C a -80°C após a chegada do kit.**

Execução do Teste

- Conduzir os reagentes à temperatura ambiente (18-25°C) antes de usar.
- Preparar **WASH BUFFER** (ver em 'Preparação do Tampão de Lavagem')
- O número necessário de tiras **MAMW**. Revenda imediatamente o saco de papelão que contém as tiras de micropoços não utilizadas.
- Pipetar 100µL da **SAMPLE**, controlo positivo (**CONTROL +** ou um positivo conhecido) e do controlo negativo (**CONTROL -** ou **MACD**), em poços individuais. Pipetando em duplicado os controlos positivos e negativos em cada série. Cobrir e incubar durante uma (1) hora à temperatura ambiente (18°C – 25°C) em câmara húmida.
- Durante os últimos 10 minutos do período de incubação, preparar o **CONJUGATE**. Adicionar 5µL de Conjugado Enzimático **MAPO** a 995µL de diluyente do conjugado **MACD** misturando bem (1 mL por cada tira de 8 poços).
- Lavar (4x) os poços, de preferência com um lavador automático de microplacas ou manualmente da seguinte forma:
- Aspirar os conteúdos dos poços. Voltar a encher com **WASH BUFFER**.
- Repetir esta operação quatro (4) vezes. Inverter a placa e bater contra papel absorvente no fim da quarta lavagem.
- NB: Segurar bem na placa ao inverter, evitando destacar as tiras.
- Adicionar 100µL de **CONJUGATE** a cada poço. Incubar durante uma (1) hora à temperatura ambiente em câmara húmida.
- Durante os últimos dez minutos da incubação, preparar o **SUBSTRATE**. Adicionar 50µL de Substrato Cromogénio **MASC** a 950µL de Tampão de Substrato **MASB** misturando bem (1 mL por cada tira de 8 poços). A solução mantém-se estável durante 30 minutos.
- Repetir a lavagem. Consultar o passo 6.
- Adicionar 100µL de **SUBSTRATE**, preparado no momento, e incubar no escuro (coberto) à temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Adicionar 50µL da Solução de Paragem **MASS**. Bater de leve na microplaca para misturar.
- Ler os resultados visualmente ou através de um espectrofotómetro, a 450nm ou 450nm/620nm; ler o branco contra o ar.

LEITURAS E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E DIAGNÓSTICO

Visualmente

Observar a intensidade da cor nos poços que contém os controlos e a amostra, respectivamente. O Controlo Positivo deve aparecer azul antes da paragem da reação, e amarelo após a sua paragem.

Leitura Fotométrica

Ler a microplaca a 450nm ou 450nm / 620nm utilizando um leitor de ELISA. Ler o "branco" contra o ar. Para os resultados aparecerem, o Controlo Negativo deve apresentar os seguintes valores:

	Valor D.O. (450nm, 450/620nm)
Controlo Negativo	< 0.1
Controlo Positivo	> 1,5
Cut-Off	= Controlo Negativo DO + 0.1

As amostras de sangue negativas devem apresentar leituras das densidades ópticas inferiores a 0.1 OD unidades. Recomendamos que cada laboratório analise as suas próprias amostras de sangue negativas conhecidas de modo a determinar o seu próprio cut-off positivo/negativo CELISA.

As amostras com valores de absorvâncias superiores ao valor cut-off acima mencionado são consideradas positivas para antígenos *P. falciparum*. Um resultado positivo indica a presença do antígeno *P. falciparum*, o que sugere a presença de infecção ou que esta existiu recentemente. Este teste detecta a infecção a *P. falciparum* em parasitêmias até 0.001%. A intensidade da cor não é proporcional ao nível de parasitemia. As infecções a *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* não são detectadas. O teste poderá dar resultados positivos durante vários dias mesmo depois dos parasitas já não serem detectáveis no sangue.

Quantificação de HRP-2

Este ensaio pode ser usado para quantificar HRP-2 diluindo em série e construindo uma curva padrão usando um controlo positivo bem definido ou um antígeno Pf-HRP-2 recombinante. O limite de detecção menor estimado é de 200-400 picogramas por mililitro (pg / mL).

Uma versão melhorada do kit Malaria Ag CELISA foi desenvolvida especificamente para a quantificação de Pf-HRP-2, a paludite Ultra-sensitive Pf-HRP-2 Quantimal™ CELISA (Código do Produto: KM8). O limite de detecção menor estimado de KM8 é tão baixo quanto 40 pg / mL. Entre em contacto com seu distribuidor ou Cellabs para obter mais informações sobre o kit ELISA adequado para suas necessidades de quantificação.

ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Deitar fora qualquer componente que tenha sido utilizado como material de risco biológico. Para mais informações consulte a MSDS

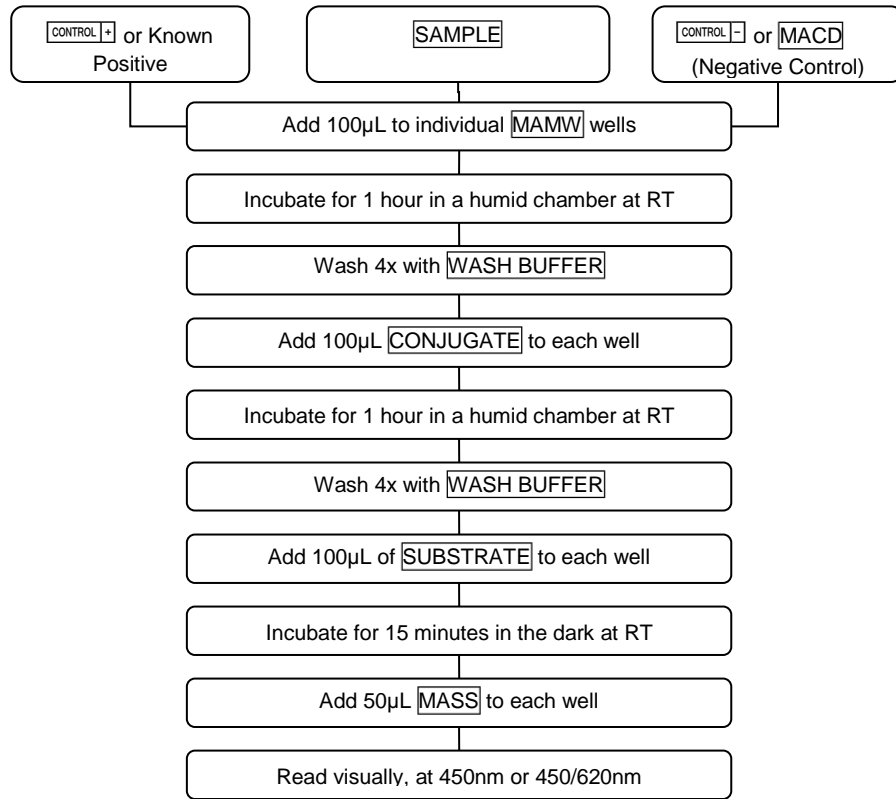
SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, & OUTROS DADOS DO MALARIA AG CELISA

Consultar o sumário no final do folheto de instruções. Todos os dados sobre o Malaria Ag CELISA podem ser consultados na folha de informação do produto. Contacte o distribuidor ou contacte a Cellabs.

NOTA SOBRE POSSÍVEIS INDEMNIZAÇÕES

As modificações realizadas aparte do protocolo recomendado podem afectar os resultados. Um resultado positivo ou negativo não exclui a presença de outros agentes causadores subjacentes. A Cellabs e os seus distribuidores não serão legalmente responsáveis por qualquer dano nestas circunstâncias.

FIGURE 1 MALARIA Ag CELISA DIAGRAM FOR USE



EXPLANATION OF SYMBOLS

- Consult Instructions for Use
- In Vitro Diagnostic Medical Device
- Temperature Limitation
- Batch
- Control Positive
- Control Negative
- Use By/Expiration Date
- Do Not Re-use

Cellabs Pty Ltd
Unit 7, 27 Dale Street
Brookvale, NSW 2100 Australia
Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426
Web: <http://www.cellabs.com.au>
Email: sales@cellabs.com.au

WMDE B.V
Bergerweg 18
6085 AT Horn
The Netherlands

Insert
Version
LM2.19
21 February 2018



TABLE 1: SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE MALARIA Ag CELISA
 TABLEAU 1: SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST MALARIA Ag CELISA
 TABELLE 1: SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND ANDERE DATEN ZUM MALARIA Ag CELISA
 TABELLA 1: SENSIBILITA', SPECIFICITA' ED ALTRI DATI SULLA MALARIA Ag CELISA
 TABLA 1: SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y OTROS DATOS DEL MALARIA Ag CELISA
 TABELA 1: SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E OUTROS DADOS DO MALARIA Ag CELISA

Trial Essai Versuch Prova Prueba Teste	Sensitivity Sensibilité Sensitivität Sensibilita' Sensibilidad Sensibilidade	Specificity Spécificité Spezifität Specificita' Especificidad Especificidade	Repeatability Répétabilité Wiederholpräzision Ripetibilità Repetibilidad Repetição	Reproducibility Reproductibilité Reproduzierbarkeit Riproducibilita Reproducibilidad Reprodutibilidade
A	98.1%	96.2%	-	-
B	98%	96%	-	-
C	-	-	Positive CV = 5.65%	Positive CV = 9.72%