



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
CONTROL1	Positive Control (freeze dried)	1 x 0.5mL	2 x 0.5mL
CONTROL2	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. Blood samples should be stored below -10°C if the analysis is delayed.

Preparation of Positive and Negative Controls

The Negative Control **CONTROL1** 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 **CONTROL2** 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 freeze dried at a concentration of 100 ng/mL. Reconstitute by adding 500µL of distilled water and standing for 5 minutes before mixing thoroughly. It is recommended to aliquot reconstituted Positive Control into smaller volumes to avoid repeat freeze-thaw cycles. Once reconstituted, store vials at -20°C until use. Dilute further to 1:10 in a microtube before using as a control in the ELISA.**

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.
- Reconstitute the Positive Control **CONTROL1** using the recommended method described in Page 1, **Preparation of Positive and Negative Controls**. Pipette 100µL of the **SAMPLE**, Negative Control **CONTROL2** and Positive Control **CONTROL1** (reconstituted and diluted to 1:10) into individual microwells. Test controls in duplicate. 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
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 parasitaemia 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

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

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-Pf MAb). L'ajout d'un échantillon dans le puits permet la liaison du complexe anti-P.f MAb 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'addition 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 CELISA™ est disponible en 3 formats :

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

Conservé 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. Evitez tout contact avec la peau, les yeux ou les membranes muqueuses. Ajouter les réactifs en évitant tout risque de contamination croisée des puits. Eviter 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 SDS) 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 **MAPT** à 950mL d'eau distillée. Libeller la bouteille **WASH BUFFER**. 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 **SAMPLE**. 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 **CONTROL** 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 **CONTROL** est un surnageant de culture contenant HRP-2, un sang positif connu peut également être utilisé comme contrôle positif interne. **IMPORTANT** : Le kit Positive Control est lyophilisé à une concentration de 100 ng/mL. Reconstituer en ajoutant 500 µL d'eau distillée et laisser reposer pendant 5 minutes avant de bien mélanger. Il est recommandé d'aliquoter le contrôle positif reconstitué dans des volumes plus petits pour éviter des cycles répétés de congélation-décongélation. Une

fois reconstitué, conserver les flacons à -20°C jusqu'à utilisation. Diluer davantage à 1:10 dans un microtube avant de l'utiliser comme contrôle dans l'ELISA.

Mode D'emploi

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant l'emploi.
- Préparer le **WASH BUFFER** (voir Préparation du Tampon de Lavage).
- Retirer le nombre requis de micropuits **MAMW**. Immédiatement refermer le sac contenant les micropuits restants avec du ruban adhésif.
- Reconstituez le contrôle positif **CONTROL** utilisant la méthode recommandée décrite à la page 1, Préparation des contrôles positifs et négatifs. Pipeter 100 µL d'échantillon **SAMPLE**, de Contrôle Négatif **CONTROL** et de Contrôle Positif (reconstitué et dilué à 1:10) dans des micropuits individuels. Tester les contrôles en double. Couvrir et incubé pendant une (1) heure à température ambiante dans une chambre humide. 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 **CONJUGATE**. Ajouter 5µL de conjugué concentré **MAPO** à 995µL de diluant de conjugué **MACD** 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 **WASH BUFFER**.
- Répéter l'opération quatre (4) fois. Après le 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 **CONJUGATE** 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 **SUBSTRATE**. Ajouter 50µL de substrat chromogène **MASC** à 950µL de tampon de substrat **MASB** 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 **SUBSTRATE** frais et incubé (couvert) à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante.
- Ajouter 50µL de solution d'arrêt **MASS**. 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 »)	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 les parasites ait disparu des examens à la goutte épaisse.

Quantification HRP-2

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

Jeté 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.

FIGURE 1 MALARIA Ag CELISA DIAGRAM FOR USE

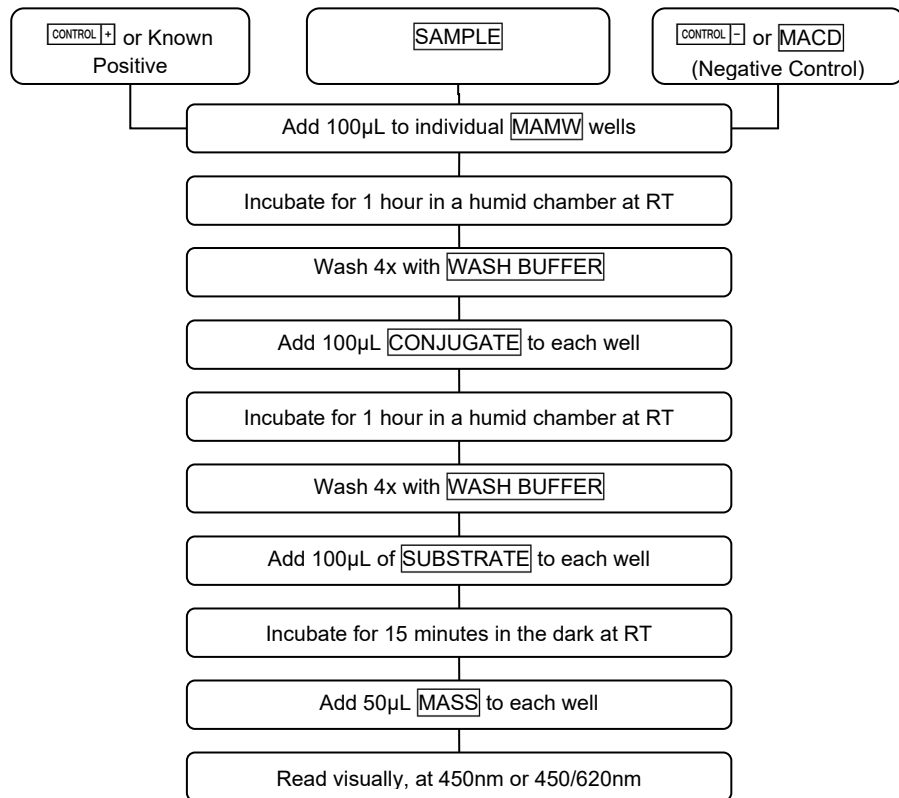


TABLE 1: SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE MALARIA Ag CELISA
TABLEAU 1: SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST MALARIA Ag CELISA

Trial Essai	Sensitivity Sensibilité	Specificity Spécificité	Repeatability Répétabilité	Reproducibility Reproductibilité
A	98.1%	96.2%	-	-
B	98%	96%	-	-
C	-	-	Positive CV = 5.65%	Positive CV = 9.72%

EXPLANATION OF SYMBOLS

- Consult Instructions for Use
- In Vitro Diagnostic Medical Device
- 2°C - 8°C 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
 LM2.21
 31 March 2023

