



Quantimal™ pLDH Malaria CELISA

English
Product Code: KM7/KM7BP

BACKGROUND AND INTENDED USE

The Quantimal™ pLDH Malaria CELISA is for the detection of malaria parasite lactate dehydrogenase (pLDH), a biomolecule common to all *Plasmodium spp.*, used as a marker for malaria diagnosis. It is well established that pLDH in malarial blood samples is indicative of active infection and its reduction mirrors the clearance of infection after treatment. Unlike histidine rich proteins like HRP-2, the pLDH enzyme is secreted only by live parasites and survives briefly in the patient blood. This kit can be used for monitoring the resistance of *Plasmodium* parasites to anti-malarial chemotherapy. It can also be used as a quantitative assay, for screening malaria in blood banks and routine clinics, and for in-vitro evaluation of anti-malarial drugs. This kit is a confirmatory test, not intended to replace the conventional blood film diagnosis, to be used with a variety of clinical samples such as whole blood, patient blood culture, plasma, serum or in-vitro preparations for drug resistance studies.

The sandwich ELISA principle is employed using microwells pre-coated with anti-pLDH monoclonal capture antibody. A second anti-pLDH monoclonal, the detector antibody, is labelled with horseradish peroxidase enzyme. If pLDH is present in a sample, it binds to the antibody coated on the well. A washing step removes the unbound components to allow a complex to form once the labelled detector antibody is added in an incubation step. A blue colour complex is developed with the addition of a substrate TMB which turns yellow after the addition of a stopping solution. The colour intensity is proportional to the amount of pLDH detected in a sample.

CONTENTS OF THE KIT

		KM7	KM7BP
MPMW	Celisa plate – 2 x 96 wells (single use)	2 plate	10 plates
CONTROL +	Positive Control	1 x 0.5 mL	1 x 1.0 mL
CONTROL -	Negative Control	1 x 2.5 mL	1 x 5.0 mL
MPPQ	Enzyme Conjugate (200x)	1 x 0.12 mL	1 x 0.7 mL
MPCD	Conjugate Diluent	1 x 24 mL	1 x 120 mL
MPPT	PBS/Tween (20x)	1 x 125 mL	2 x 250 mL
MPSC	Substrate Chromogen (TMB) (20x)	1 x 1.2 mL	1 x 7.0 mL
MPSB	Substrate Buffer	1 x 24 mL	1 x 125 mL
MPSS	Stopping Solution	1 x 12 mL	2 x 30 mL

Store 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

Distilled water, micropipettes and tips, clean glassware or plastic containers for solutions, humid chamber, ELISA washer, ELISA plate reader to read absorbances at a single wavelength of 450nm or at dual wavelength of 450nm and 620nm

PRECAUTIONS

For in-vitro diagnostic use only. Do not use 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. Thiomerosal preservative added to some components is a poison. Exercise caution when handling these components. The stopping solution is corrosive. Avoid contact with skin, eye 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 Material Safety Data Sheet.

INSTRUCTIONS FOR USE

IMPORTANT: The positive control is time and temperature sensitive and stable for a maximum of 4 months at 2-8°C. We strongly recommend that the vial is stored frozen at -20°C to -80°C immediately when kits are received. The vial can remain frozen until use.

Preparation of Wash Buffer

Wash buffer is provided at 20x concentrate. If crystals are present, pre-warm the concentrate and stir on a magnetic stirrer until all crystals are dissolved. For each microplate, add 50mL PBS-Tween concentrate **MPPT** to 950mL of distilled water. Label the bottle 1x **WASH BUFFER** and store at 2-8°C. This buffer is used for diluting test samples, diluting the conjugate concentrate **MPPQ** and washing the microplates.

Preparation of samples

Collect patient blood by standard venepuncture procedure using an anticoagulant. Blood specimens should be stored below -10°C if the analysis is delayed. Fresh, refrigerated or frozen samples of serum, plasma or blood may be used. Avoid contamination by collecting aseptically. The **CONTROL +** is culture supernatant and needs to be diluted 1:1 with the **CONTROL -**. This can be prepared directly into the well by adding 50µL of **CONTROL +** + 50µL of **CONTROL -**, a total volume of 100µL each well. The negative control **CONTROL -** is RPMI and this is to be tested neat, directly into the well. All test samples are to be diluted 1:1 with prepared diluent (1x **WASH BUFFER**) and can be prepared directly into the wells.

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 **MPMW** strips. Firmly reseal the snap-lock foil bag containing unused microwell strips.
- Controls: Pipette 100µL volume duplicates of each of the controls according to the above recommended instructions.
- Samples: Pipette 50µL of 1x **WASH BUFFER** directly into the well(s) followed by 50 µL of each of the sample(s), taking care not to cross-contaminate the neighbouring wells. Change pipette tips after each sample addition. Gently tap the side of the ELISA frame to give the wells a gentle mix.
- Place the plate in a humidity chamber and incubate for 30 minutes at 37°C. A humidity chamber can be any plastic box with a flat bottom and a lid.
- In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength **CONJUGATE**. Add 5µL of conjugate concentrate **MPPQ** to 995µL of conjugate diluent **MPCD** and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells).
- Wash the wells four 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 four (4) times. After the fourth wash, bang inverted wells dry on absorbent tissue.
 - NB: take care when flicking out plates, hold side of frame firmly to hold strips in place.
- Add 100µL of diluted **CONJUGATE** to each well. Incubate for 30 minutes in a humid chamber at 37°C.
- In the last 10 minutes of the incubation period, prepare the working strength **SUBSTRATE**. Add 50µL of substrate chromogen **MPSC** to 950µL of substrate buffer **MPSB** and mix thoroughly (allow 1mL per strip of 8 wells). The stability of the solution is 15 minutes.
- Repeat washing as in step 8.
- Add 100µL of fresh **SUBSTRATE** and incubate in the dark (covered) at room temperature for 15 minutes.
- Add 50µL of Stopping Solution **MPSS**. Tap the plate to mix.
- Read the results visually or in a spectrophotometer preferably at 450nm/620nm (or 450nm).

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 450/620 in a compatible ELISA plate reader, blanked against air. For the test results to be accepted the controls must read as follows:

	O.D. Value (450nm or 450/620nm)
Negative Control	O.D < 0.2
Positive Control	O.D > 1.5
Cut-off value (COV)	O.D 0.25

The cut-off value (COV) specified for the Quantimal™ pLDH Malaria CELISA was determined by testing 292 samples from a non-endemic area. Any sample with an optical density (OD) value above the COV is considered positive for pLDH. A positive result indicates the presence of pLDH from *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* or *Plasmodium knowlesi*. The Quantimal™ pLDH Malaria CELISA does not distinguish between different species of *Plasmodium* infections. To detect specific infection caused by *Plasmodium falciparum*, contact Cellabs Pty Ltd for information on the Malaria Antigen (HRP-2) CELISA.

Quantification

This assay can be used for the quantification of pLDH, please contact Cellabs at enquiries@cellabs.com.au for further details on how to construct a standard curve using the positive control provided with the kit.

WASTE DISPOSAL

Dispose of any unused component as bio-hazardous waste. For more information, please refer to the MSDS.

INDEMNITY NOTICE

Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims and performance of the kit. Cellabs and its agents or distributors are not liable for damages under these circumstances.



Quantimal™ pLDH Malaria CELISA

Français

Product Code: KM7/KM7BP

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Le Quantimal™ pLDH Malaria CELISA est destiné à la détection de la lactate déshydrogénase parasitaire du paludisme (pLDH), une biomolécule commune à tous les *Plasmodium* spp.. Utilisée comme marqueur du diagnostic du paludisme. Il est bien établi que la pLDH dans les échantillons de sang prélevés sur le paludisme indique une infection active et que sa réduction reflète l'élimination de l'infection après le traitement. Contrairement aux protéines riches en histidine comme HRP-2, l'enzyme pLDH n'est sécrétée que par des parasites vivants et survit brièvement dans le sang du patient. Ce kit peut être utilisé pour surveiller la résistance des parasites *Plasmodium* à la chimiothérapie antipaludique. Il peut également être utilisé comme un dosage quantitatif, pour le dépistage du paludisme dans les banques de sang et les cliniques de routine, et pour l'évaluation in vitro des médicaments antipaludéens. Ce kit est un test de confirmation, non destiné à remplacer le diagnostic conventionnel du sang, destiné à être utilisé avec divers échantillons cliniques tels que sang total, hémocultures, plasma, sérum ou préparations in vitro pour des études de pharmacorésistance.

Le principe ELISA en sandwich est utilisé en utilisant des micropuits pré-enrobés avec un anticorps de capture monoclonal anti-pLDH. Un second anticorps monoclonal anti-pLDH, l'anticorps détecteur, est marqué avec l'enzyme peroxydase de raifort. Si pLDH est présent dans un échantillon, il se lie à l'anticorps déposé sur le puits. Une étape de lavage élimine les composants non liés pour permettre à un complexe de se former une fois que l'anticorps détecteur marqué est ajouté dans une étape d'incubation. Un complexe de couleur bleue est développé avec l'addition d'un substrat TMB qui devient jaune après l'addition d'une solution d'arrêt. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de pLDH détectée dans un échantillon.

COMPOSITION DU COFFRET

		KM7	KM7BP
	Plaque CELISA – 1 x 96 puits (usage unique)	2 plaque	10 plaques
	Contrôle Positif	1 x 0.5 ml	1 x 1.0 ml
	Contrôle Négatif	1 x 2.5 ml	1 x 5.0 ml
	Conjugué enzymatique (200x)	1 x 0.12 ml	1 x 0.7 ml
	Diluant pour conjugué	1 x 24 ml	1 x 120 ml
	PBS/Tween (20x)	1 x 125 ml	2 x 250 ml
	Substrat Chromogène (TMB) (20x)	1 x 1.2 ml	1 x 7.0 ml
	Tampon de substrat	1 x 24 ml	1 x 125 ml
	Solution d'arrêt	1 x 12 ml	2 x 30 ml

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Eau distillée, micropipettes et embouts, verrerie propre ou récipients plastiques pour solutions, chambre humide, laveur ELISA ou bouteille de rinçage, lecteur de plaques ELISA capable de lire à 450nm or 450/620nm.

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. Ajoutez les réactifs en évitant tout risque de contamination croisée des puits. Evitez d'exposer le substrat chromogène à la lumière. Les échantillons cliniques et les contrôles doivent être considérés comme potentiellement infectieux et jetés selon les procédures adéquates. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice SDS) pour plus amples informations.

INSTRUCTIONS D'EMPLOI

IMPORTANT: Le contrôle positif est temps et sensible à la température et stable pour un maximum de 4 mois à 2-8°C. Nous recommandons fortement que le flacon est conservé congelé à -20 ° C immédiatement lorsque kits sont reçus. Le flacon peut rester congelés jusqu'à utilisation.

Préparation du tampon de lavage

Si des cristaux apparaissent, réchauffer le réactif pour les dissoudre sur un agitateur magnétique jusqu'à leur disparition totale. Pour chaque plaque de micropuits, ajouter 50ml de concentré PBS/Tween à 950ml d'eau distillée. Libeller la bouteille et conserver à 2-8°C. Ce tampon est utilisé pour diluer les échantillons d'essai, concentré de conjugué et laver les plaques.

Préparation des échantillons de sang

Collecter l'échantillon patient par ponction veineuse normale sous anticoagulant. Congeler les échantillons sanguins en dessous de -10°C si l'analyse est retardée.

Préparation des échantillons de sérum ou plasma. Contrôles Positifs et Négatifs :

Le contrôle positif est le surnageant de culture et le contrôle négatif est RPMI. Préparer le contrôle positif par dilution de 1 à 1 avec le contrôle négatif. Les échantillons d'essai peuvent être préparés directement par les puits en ajoutant dans 50 pi par du diluant préparé (tampon de lavage 1X), puis en ajoutant 50 pi de sang total, le sérum ou échantillon de plasma. Mélanger soigneusement.

Mode D'emploi

- Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25P°C) avant l'emploi.
- Préparer le **WASH BUFFER** (voir Préparation du Tampon de Lavage).
- Retirer le nombre requis de micropuits **MPMW**. Immédiatement refermer le sac contenant les micropuits restants avec du ruban adhésif.
- Contrôles: Pipeter des duplicatas de volume de 100 µL de chacune des commandes selon les instructions recommandées ci-dessus.
- Échantillons: Pipeter 50 µL de tampon de lavage 1x directement dans le (s) puits, puis 50 µL de chaque échantillon (s) en prenant soin de ne pas contaminer les puits voisins. Changer les embouts de pipette après chaque addition d'échantillon. Tapoter doucement le côté du cadre ELISA pour donner un mélange délicat aux puits.
- Placer la plaque dans une chambre humide et incuber pendant 30 minutes à 37°C. Une chambre d'humidité peut être n'importe quelle boîte en plastique avec un fond plat et un couvercle.
- Dans les 10 dernières minutes de la période d'incubation, préparer le **CONJUGATE** de force de travail. Ajouter 5µL de concentré de conjugué **MPPC** à 995µL de diluant conjugué **MPCD** et mélanger soigneusement (laisser 1ml par bande de 8 puits).
- Laver les puits quatre fois, de préférence à l'aide d'une laveuse automatique à plaques / bandes ou manuellement comme suit:
 - Videz le contenu des puits. Remplissez avec le tampon de lavage.
 - Répétez ce processus quatre (4) fois. Après le quatrième lavage, cogner les puits inversés à sec sur un tissu absorbant.
 - Remarque: attention lors de l'éjection des assiettes, tenir fermement le côté du cadre pour maintenir les lamelles en place.
- Ajouter 100µL de **CONJUGATE** dilué dans chaque puits. Incuber pendant 30 minutes dans une chambre humide à 37°C.
- Dans les 10 dernières minutes de la période d'incubation, préparer le **SUBSTRATE** de force de travail. Ajouter 50µL de substrat chromogène MPSC à 950µL de tampon substrat **MPSB** et bien mélanger (laisser 1ml par bande de 8 puits). La stabilité de la solution est de 15 minutes.
- Répétez le lavage comme à l'étape 8.
- Ajouter 100µL de **SUBSTRATE** frais et incubé dans l'obscurité (couvert) à température ambiante pendant 15 minutes.
- Ajouter 50µL de solution d'arrêt MPSS. Appuyez sur la plaque pour mélanger.
- Lire les résultats visuellement ou dans un spectrophotomètre de préférence à 450 nm / 620 nm (ou 450 nm).

LECTURE DES RESULTATS

Lecture visuelle

Observer l'intensité couleur des échantillons et des contrôles. Les contrôles positifs doivent être bleu avant l'étape 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	< 0.20
Contrôle Positif	> 0.1.5
COV	0.25

Les échantillons de sang négatifs doivent donner une densité optique inférieure à 0.2 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.

Quantification

Ce dosage peut être utilisé pour la quantification de pLDH, veuillez contacter Cellabs à enquiries@cellabs.com.au pour plus de détails sur la façon de construire une courbe standard en utilisant le contrôle positif fourni avec le kit.

DECHETS

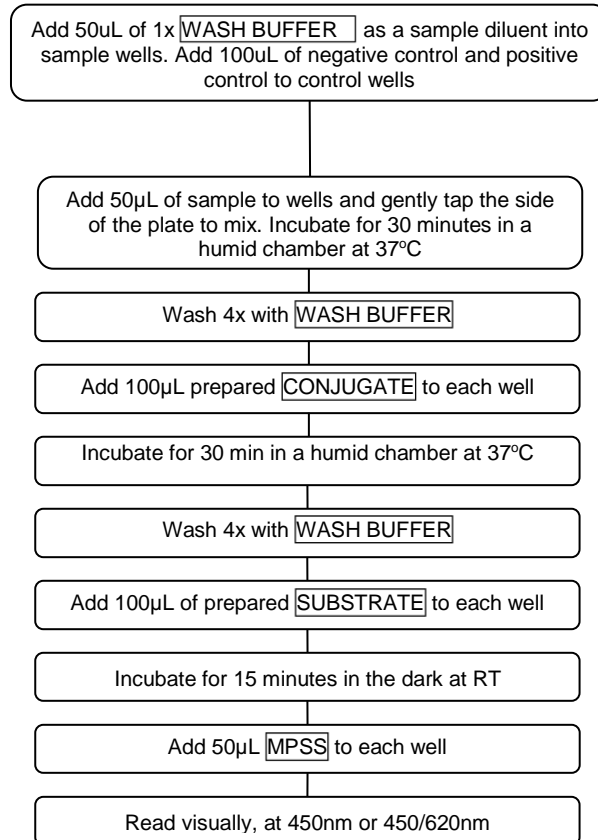
Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

SENSIBILITE, SPECIFICITE ET AUTRES DONNEES DU TEST

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 Quantimal™ pLDH Malaria CELISA**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.
Bergenweg 18
6085 AT Horn
The Netherlands

Insert
Version

LM7.12

08 June 2018

