



Instructions for Use

Ascaris lumbricoides IgG ELISA

IVD



REF EIA-3817

 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTRODUCTION.....	2
2	INTENDED USE.....	2
3	PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
4	MATERIALS.....	3
5	STABILITY AND STORAGE	3
6	REAGENT PREPARATION	4
7	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	RESULTS.....	6
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	6
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	7
12	PRECAUTIONS AND WARNINGS	7
1	EINLEITUNG.....	8
2	VERWENDUNGSZWECK.....	8
3	TESTPRINZIP	8
4	MATERIALIEN	9
5	STABILITÄT UND LAGERUNG	9
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	10
7	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN	10
8	TESTDURCHFÜHRUNG	11
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
10	TESTMERKMALE	12
11	GRENZEN DES VERFAHRENS	13
12	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	13
1	INTRODUZIONE.....	14
2	USO PREVISTO	14
3	PRINCIPIO DEL TEST	14
4	MATERIALI	15
5	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE	15
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	16
7	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	16
8	PROCEDIMENTO	17
9	RISULTATI.....	18
10	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	18
11	LIMITAZIONI	19
12	PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....	19
13	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA.....	20
14	SCHEME OF THE ASSAY	21
	SYMBOLS USED.....	22

1 INTRODUCTION

Ascaridae are big nematodes. The male individuals are up to 25 cm, the female ones are up to 40 cm long.

Ascaris lumbricoides is among the Ascaridae the species with the highest importance for human medicine, because it is the only one with humans as main host.

The sexually mature roundworm lives in the small intestine. The females produce up to 200 000 eggs daily, which attain to the environment by faeces. Infectious larvae develop inside the eggs and after oral ingestion they hatch in the upper part of the small intestine. They penetrate the wall of the intestine and get into the venous blood with which they get into liver and lung, where they leave the vessels and skin in the aveoles. The larvae migrate into the trachea and through the pharynx after swallowing back to the small intestine where the maturation to the adult worm takes place. Ca. 10-12 weeks after infestation the roundworms will be excreted with faeces. The adult worm lives for around 18 months.

Ascaris lumbricoides is one of the most abundant exciter of infectious diseases worldwide. Main endemic areas are Eastern Asia, Africa and Middle and South America. Children are more often affected than adults. The infestation leads to Ascariasis mostly with latent progression. The migrating larvae can lead to inflammatory, eosinophile infiltration of the lung and cause cough, dyspnoea and light fever. Conglomerates of the worms can cause intestinal blockage. If the worms migrate into gall, pancreas or stomach the corresponding clinical symptoms result.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis	Adult worms cause no symptoms in general. Conglomerates of worms can cause abdominal pain and ileus. Infection of gall, stomach or pancreas leads to corresponding symptoms. Migrating larvae are able to cause pulmonal symptoms like cough and dyspnoea.	Ingestion of infectious Ascaridae eggs (classical way of infestation is the consumption of insufficient washed salad)

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy: Detection of eggs in faeces
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2 INTENDED USE

The *Ascaris lumbricoides* IgG ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Ascaris lumbricoides* in human serum or plasma (citrate, heparin).

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microtiterplate reader.

4 MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Microtiterplate:**
12 break-apart 8-well snap-off strips coated with *Ascaris lumbricoides* antigens; in resealable aluminium foil.
- **Sample Dilution Buffer:**
1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stop Solution:**
1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):**
1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Conjugate:**
1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled Protein A in phosphate buffer (10 mM); coloured blue, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:**
1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:**
1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:**
1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2 Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3 Materials and Equipment needed

- ELISA microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5 STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2 °C - 8 °C.

The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2 °C - 8 °C.

6 REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20 °C - 25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1 Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Ascaris lumbricoides* antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2 °C - 8 °C.

6.2 Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e.g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water.

The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20 °C - 25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3 TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2 °C - 8 °C, away from the light.

The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay.

If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2 °C - 8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 °C to -20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing.

Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1 Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted **1 + 100** with IgG Sample Dilution Buffer.

Dispense 10 µL sample and 1 mL IgG Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8 ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 μ L to 350 μ L to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 °C \pm 1 °C.

1. Dispense 100 μ L standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 °C \pm 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 μ L of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 seconds. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 μ L Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 μ L TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 μ L Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1 Measurement

Adjust the ELISA microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9 RESULTS

9.1 Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2 Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86/2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1 Results in Units [DU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ DU}$$

9.3 Interpretation of Results

Cut-off	10 DU	-
Positive	> 11 DU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 DU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 DU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

For further information about the specific performance characteristics please contact DRG.

10.1 Precision

Intra assay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.295	3.54
#2	24	0.539	4.55
#3	24	0.657	6.16
Inter assay	n	Mean (DU)	CV (%)
#1	12	18.48	2.77
#2	12	6.35	8.02
#3	12	22.58	4.03

10.2 Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 95.0 % (95% confidence interval: 87.69% - 98.62%).

10.3 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100% (95% confidence interval: 47.82% - 100%).

10.4 Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5 Cross Reactivity

Cross reaction with antibodies against *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* and *Strongyloides* cannot be excluded.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12 PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1 Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.



Warning

H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2 Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1 EINLEITUNG

Askariden oder Spulwürmer sind große Nematoden (Rundwürmer). Die männlichen Individuen können bis zu 25 cm, die weiblichen bis zu 40 cm lang werden. *Ascaris lumbricoides* kommt unter den Askariden die größte humanmedizinische Bedeutung zu, da dieser der einzige ist, bei dem der Mensch als Hauptwirt auftritt.

Die geschlechtsreifen, getrenntgeschlechtlichen Spulwürmer leben im Dünndarm. Die weiblichen Individuen produzieren täglich bis zu 200 000 Eier, die mit den Fäzes an die Umwelt verbracht werden. In diesen entwickelt eine infektiöse Larve, die nach oraler Aufnahme der Eier im oberen Dünndarm schlüpft, die Darmwand durchdringt, Anschluss an das venöse Blutgefäßsystem findet und über die Leber in die Lunge gelangt. Dort verlassen sie das Gefäßsystem und häuten sich in den Alveolen. Die Larven wandern dann in den luftführenden Systemen der Lunge zur Trachea und gelangt über den Pharynx nach Verschlucken wieder in den Dünndarm, wo die Reifung zum adulten Wurm erfolgt. Etwa 10-12 Wochen nach der Infestation werden Spulwürmer im Stuhl ausgeschieden. Adulte Askariden werden ca. 18 Monate alt.

Ascaris lumbricoides ist einer der weltweit häufigsten Erreger von Infektionskrankheiten. Hauptendemiegebiete finden sich in Ländern Ostasiens, Afrikas und Lateinamerikas. Kinder sind häufiger betroffen als Erwachsene.

Die Infestation führt zur Askariose, einer meist latent verlaufenden Krankheit. Die wandernden Larven können zu entzündlichen, eosinophilen Infiltrationen (Löfflersches Infiltrat) in der Lunge führen und Ursache von Husten, Dyspnoe und leichtem Fieber sein. Würmerkonglomerate können einen Darmverschluss (Wurmileus) bewirken, wandern Würmer in die Gallenwege, ins Pankreas oder den Magen, resultieren entsprechende klinische Erscheinungsbilder (z.B. Ikterus durch Abflussstörungen der Gallenwege, etc.).

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Askariose	Adulte Würmer verursachen in der Regel keine Symptome. Würmerkonglomerate können Ursache von Abdominalschmerzen und eines Ileus sein. Befall von Gallengang, Magen, Pankreas führt zu entsprechenden Symptomen. Wandernde Larven können pulmonale Symptome verursachen (z.B. Husten, Dyspnoe).	Aufnahme infektiöser Askariden-Eier (klassischer Weg der Aufnahme ist der Genuss von schlecht gewaschen Salates)

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie: Nachweis von Eiern in Stuhl
- Serologie: Nachweis von Antikörpern mittels ELISA

2 VERWENDUNGSZWECK

Der *Ascaris lumbricoides* IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Ascaris lumbricoides* in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3 TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschrift wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4 MATERIALIEN

4.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:**
12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Ascaris lumbricoides Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:**
1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH $7,2 \pm 0,2$; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Stopplösung:**
1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):**
1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH $7,2 \pm 0,2$; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:**
1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugiertem Protein A in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:**
1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), $< 0,1\%$; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:**
1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 12.1.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3 Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5 STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2 °C - 8 °C lagern.

Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1 Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit *Ascaris lumbricoides* Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 °C - 8 °C lagern.

6.2 Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3 TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2 °C - 8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren.

Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden.

Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70 °C bis -20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1 Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis **1 + 100** mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen,

z. B. 10 µL Probe und 1 mL IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8 TESTDURCHFÜHRUNG

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf bis zu fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.1 Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1 Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < **0,100**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **0,200** und < **Cut-off**
- **Cut-off-Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2 Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off-Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off-Kontrolle + 0,42 OD Cut-off-Kontrolle = 0,86/2 = 0,43

Cut-off = 0,43

9.2.1 Ergebnisse in Einheiten [DU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{DRG Einheiten} = \text{DU}]$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 DU	-
Positiv	> 11 DU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 DU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 DU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

10 TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte DRG.

10.1 Präzision

Intra-Assay	n	Mittelwert (E)	VK (%)
#1	24	0,295	3,54
#2	24	0,539	4,55
#3	24	0,657	6,16
Inter-Assay	n	Mittelwert (DU)	VK (%)
#1	12	18,48	2,77
#2	12	6,35	8,02
#3	12	22,58	4,03

10.2 Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 95,0% (95% Konfidenzintervall: 87,69% - 98,62%).

10.3 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 100% (95% Konfidenzintervall: 47,82% - 100%).

10.4 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL Hämoglobin, 5 mg/mL Triglyceride und 0,5 mg/mL Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

10.5 Kreuzreaktivität

Eine Kreuzreaktion mit *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* und *Strongyloides* kann nicht ausgeschlossen werden.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1 Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 4.1)

Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.



Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden.

12.2 Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

1 INTRODUZIONE

Gli Ascaridi sono grandi nematodi. Gli individui maschi raggiungono i 25 cm, quelli femminili raggiungono i 40 cm di lunghezza. *Ascaris lumbricoides* è tra gli Ascaridi la specie con la più alta importanza per la medicina umana, perché è l'unico ad utilizzare gli esseri umani come ospiti principali. Il verme sessualmente maturo vive nel piccolo intestino. Le femmine producono fino a 200000 uova quotidianamente, le quali raggiungono l'ambiente esterno attraverso le feci. Le larve infettive si sviluppano dentro le uova e dopo ingestione orale nascono nella parte superiore del piccolo intestino. Le larve dall'intestino raggiungono il sangue venoso per mezzo del quale entrano nel fegato e nei polmoni, dove migrano negli alveoli tramite i vasi e la pelle. Le larve migrano nella trachea e attraverso la faringe raggiungono il piccolo intestino dove ha luogo la maturazione a verme adulto. Circa 10-12 settimane dopo l'infezione, il verme sarà espulso con le feci. Il verme adulto vive per circa 18 mesi.

L'*Ascaris lumbricoides* è uno dei principali fattori scatenanti di malattie infettive in tutto il mondo. Le aree endemiche principali sono Asia Orientale, Africa, Medio Oriente e Sud America. I bambini sono colpiti più spesso degli adulti. L'infestazione causa ascariasi prevalentemente in maniera asintomatica. Le larve che migrano possono portare infiammazioni, infiltrazioni eosinofile nei polmoni causando tosse, dispnea e febbre leggera. I conglomerati dei vermi possono causare ostruzione intestinale. Migrazioni dei vermi verso bile, pancreas o stomaco causano sintomi clinici corrispondenti.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasi	I vermi adulti generalmente non causano sintomi. Conglomerati dei vermi possono causare dolori addominali ed iliaci. Infezioni di bile, stomaco o pancreas portano ai sintomi corrispondenti. Larve migranti sono in grado di causare sintomi polmonari come tosse e dispnea	Ingestione di uova di Ascaridi infette (una classica via d'infezione è il consumo di insalata non pulita bene.)

L'infezione o la presenza di un agente patogeno può essere identificata da:

- Microscopia: Rilevazione di uova nelle feci
- Sierologia: Rilevazione di anticorpi con metodo ELISA

2 USO PREVISTO

Il *Ascaris lumbricoides* IgG ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per *Ascaris lumbricoides* nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

3 PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatico qualitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un fotometro per piastre di microtitolazione ELISA.

4 MATERIALI

4.1 Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:**
12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni di *Ascaris lumbricoides*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione IgG:**
1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH $7,2 \pm 0,2$; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Soluzione Bloccante:**
1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di Lavaggio (20x conc.):**
1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH $7,2 \pm 0,2$; tappo bianco.
- **Coniugato:**
1 flacone contenente 20 mL della Proteina A coniugata con perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione Substrato TMB:**
1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), $< 0,1\%$; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo Positivo:**
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:**
1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:**
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 12.1.

Per le sostanze potenziali pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3 Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per piastre di microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di piastre di microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 10 - 1000 μ L
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C.

I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2 °C - 8 °C.

6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) e mescolare prima di iniziare il test!

6.1 Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con l'antigeni di *Ascaris lumbricoides*.

Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampone di Lavaggio (20x conc.)

Diluire il Tampone di lavaggio 1+19; per esempio. 10 mL del Tampone di lavaggio + 190 mL di acqua distillata.

Il Tampone di lavaggio diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3 Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrate, eparina) umano.

Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70 °C a -20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1 Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni **1 + 100** con Tampone di Diluizione del Campione IgG.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di Tampone di Diluizione del Campione + 1 mL di tampone IgG e mescolare bene (Vortex).

8 PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso prima di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 µL a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eeguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

1. Pipettare 100 µL di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo!
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante! Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi.
5. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente ($20\text{ °C} - 25\text{ °C}$).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20\text{ °C} - 25\text{ °C}$) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

8.1 Misurazione

Regolare il fotometro per le piastre di microtitolazione ELISA a **zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori di l'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

9 RISULTATI

9.1 Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti Istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza < **0,200 e < Cut-off**
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2 Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off
 $0,42 = 0,86/2 = 0,43$
 Cut-off = 0,43

9.2.1 Risultati in unità [DU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità DRG} = \text{DU}]$

Esempio: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ DU}$

9.3 Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino).
Zona grigia	9 – 11 DU	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. Se il risultato è nuovamente nella zona grigia il campione viene giudicato come negativo .
Negativo	< 9 DU	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile.

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

10 CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato, questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare DRG.

10.1 Precisione

Intra dosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	0,295	3,54
#2	24	0,539	4,55
#3	24	0,657	6,16
Inter dosaggio	n	Media (DU)	CV (%)
#1	12	18,48	2,77
#2	12	6,35	8,02
#3	12	22,58	4,03

10.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. La specificità diagnostica è 95,0% (95% intervallo di confidenza: 87,69% - 98,62%).

10.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. La sensibilità diagnostica è 100% (95% intervallo di confidenza: 47,82% - 100%).

10.4 Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici et itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,5 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

10.5 Reattività crociata

Reazioni crociate con anticorpi contro *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* e *Strongyloides* non possono essere esclusi.

11 LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo può alterare i valori delle assorbanze.

12 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

12.1 Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 4.1)

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.



Attenzione

H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

12.2 Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

1. Cook, Gordon C.; Manson, Patrick (Eds.) (1998): Manson's tropical diseases. 20. ed., 4. print. London: Saunders.
2. McSharry, Charles; Xia, Yu; Holland, Celia V.; Kennedy, Malcolm W. (1999): Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. In *Infection and Immunity* 67 (2), pp. 484–489.
3. Seltzer, Elyse; Barry, Michelle; Crompton; D. W. T. (2006): Ascariasis. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 1257–1264.

▪ Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

14 SCHEME OF THE ASSAY













Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
 Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit.
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 °C ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Código de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Estable hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité
MTP	Microtiterplate	Mikrotiterplatte	Piastre di Microtitolazione	Placa de Microtitulación	Plaque de Microtitrage
CONJ	Conjugate	Konjugat	Coniugato	Conjugado	Conjugué
CONTROL –	Negative Control	Negativkontrolle	Controllo negativo	Control positivo	Contrôle négatif
CONTROL +	Positive Control	Positivkontrolle	Controllo positivo	Control positivo	Contrôle positif
CUT OFF	Cut off control	Cut off-Kontrolle	Controllo Cut-off	Control Cut-off	Contrôle Cut-off
CAL	Standard or Calibrator	Standard oder Kalibrator	Standard o Calibratore	Estándar o Calibrador	Standard o Etalon
DIL	Sample Dilution Buffer	Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione	Tampón de Dilución de Muestra	Tampon de Dilution d'Échantillon
DIL A	IgA Sample Dilution Buffer	IgA-Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgA	Tampón de Dilución de Muestra IgA	Tampon de Dilution d'Échantillon IgA
DIL G	IgG Sample Dilution Buffer	IgG-Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgG	Tampón de Dilución de Muestra IgG	Tampon de Dilution d'Échantillon IgG
DIL M	IgM Sample Dilution Buffer	IgM-Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgM	Tampón de Dilución de Muestra IgM	Tampon de Dilution d'Échantillon IgM
SOLN STOP	Stop solution	Stopplösung	Soluzione bloccante	Solución de parada	Solution d'arrêt
SUB TMB	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Soluzione substrato TMB	Solución de sustrato de TMB	Solution de substrat TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated	Waschpuffer 20x konzentriert	Tampone di lavaggio concentrazione x20	Tampón de lavado concentrado x20	Tampon de lavage concentré 20 x