



User's Manual



Trichinella spiralis IgG ELISA

Enzyme Immunoassay for the qualitative determination of IgG class antibodies against Trichinella spiralis in human serum or plasma



EIA-3866



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG 

DRG International, Inc.
USA
Telephone: (908) 233-2079
Fax: (908) 233-0758
E-Mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

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

1	INTRODUCCIÓN	22
2	USO PREVISTO	22
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO.....	22
4	MATERIALES	23
5	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE	23
6	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	24
7	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	24
8	PROCEDIMIENTO.....	25
9	CALCULO DE LOS RESULTADOS	26
10	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	26
11	LIMITACIONES DEL ENSAYO.....	27
12	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS.....	27
13	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA.....	28
14	SCHEME OF THE ASSAY	28
	SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS.....	29

1 INTRODUCTION

Trichinosis (also called trichinellosis) is caused by nematodes (roundworms) of the genus *Trichinella*. In addition to the classical agent *Trichinella spiralis*, which is found worldwide in many carnivorous and omnivorous animals, four other species (*T. pseudospiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, and *T. britovi*) are recognized. Trichinosis is acquired by ingesting meat containing cysts of *Trichinella*. After exposure to gastric acid and pepsin, the larvae are released from the cysts and invade the small bowel mucosa where they develop into adult worms (female 2.2 mm in length, males 1.2 mm). After 1 week, the females release larvae that migrate to the striated muscles where they encyst. Encystment is completed in 4 to 5 weeks and the encysted larvae may remain viable for several years. Ingestion of the encysted larvae perpetuates the cycle.

Trichinosis infection occurs worldwide, but is most common in parts of Europe and the United States. Light infections may be asymptomatic. For mild to moderate infections, most symptoms subside within a few months whereas fatigue, weakness, and diarrhoea may last for months. In severe cases, death can occur.

Species	Disease	Symptoms	Mechanism of Infection
<i>Trichinella spiralis</i>	Trichinosis	<p>Nausea, diarrhoea, vomiting, fatigue, fever and abdominal discomfort.</p> <p>Larval migration into muscle tissue can cause edema, conjunctivitis, myalgias, splinter hemorrhages, rashes and blood eosinophilia.</p> <p>Occasional life-threatening manifestations include myocarditis, central nervous system involvement and pneumonitis points</p>	<p>Infection can only occur by eating raw or undercooked pork and wild game products infected with the larvae of <i>Trichinella</i> worms.</p>

Infection may be identified by

- Microscopy, muscle biopsy
- Serology: Detection of antibodies by ELISA

2 INTENDED USE

The DRG *Trichinella spiralis* IgG-ELISA is intended for the qualitative determination of IgG class antibodies against *Trichinella spiralis* in human serum or plasma (citrate).

3 PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

Microtiter strip wells are precoated with *Trichinella spiralis* ES-antigens (Excretory/Secretory antigens) to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled Protein A Conjugate is added. This conjugate binds to the captured *Trichinella spiralis*-specific antibodies. 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 *Trichinella spiralis* specific antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance alternative 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4 MATERIALS

4.1 Reagents supplied

- **Trichinella spiralis Coated Wells:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Trichinella spiralis antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):*** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- **Trichinella spiralis Protein A Conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase Protein A; coloured blue, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Trichinella spiralis Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Trichinella spiralis Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Trichinella spiralis Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2 Materials supplied

- 1 Strip holder
- 2 Cover foils
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3 Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5 STABILITY AND STORAGE

The 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, samples and controls to room temperature (20 to 25°C) before starting the test run!

6.1 Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with Trichinella spiralis antigen. Store at 2°C - 8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2°C - 8°C; stability until expiry date.*

6.2 Trichinella spiralis Protein A Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with Protein A, horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. Protein A is an immunoglobulin Fc-binding protein with a molecular weight of 42,000 Daltons. The solution is ready to use. Store at 2°C - 8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2°C - 8°C.*

6.3 Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It has to be stored at 2°C - 8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2°C - 8°C.*

6.4 IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2°C - 8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2°C - 8°C.*

6.5 Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date*

6.6 TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. 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 have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be discharged. After first opening stability until expiry date when stored at 2°C - 8°C.*

6.7 Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2°C - 8°C.

After first opening stability until expiry date.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2°C - 8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°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 Diluent.

Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1 + 100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8 ASSAY PROCEDURE

8.1 Test Preparation

Please read the test protocol carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well (e.g. A1) for the substrate blank,

1 well (e.g. B1) for the negative control,

2 wells (e.g. C1+D1) for the cut-off control and

1 well (e.g. E1) for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate.

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

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

Adjust the incubator to $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100µl Trichinella spiralis Protein A Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with IgG Sample Diluent and multiply the results in DU by 2.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2 Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 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 control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

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

9 RESULTS

9.1 Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value **< 0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value **< 0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: 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 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38
Cut-off = 0.38

9.3 Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ grey zone

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1 Results in DRG Units

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

Example: $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ DU (DRG Units)}$

Cut-off:	10	DU
Grey zone:	9-11	DU
Negative:	<9	DU
Positive:	>11	DU

10 SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1 Precision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	4	0.73	5.2
<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean</u>	<u>Cv (%)</u>
Pos. Serum	8	0.70	3.9

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 94.8 %.

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 >95 %.

10.4 Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

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

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

Cross reactions with antibodies against *Toxocara canis* are possible.

12 PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits 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 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. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips 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 control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

12.1 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

Trichinella spiralis ist der Erreger der Trichinose, einer weltweit verbreiteten Erkrankung des Menschen und zahlreicher Tiere. Trichinellen gehören zu den Fadenwürmern (Nematoden). Sie sind Gewebeparasiten primär von karnivoren (Fleischfresser) und omnivoren (Allesfresser) Säugetieren, einschließlich des Menschen. Neben Trichinella spiralis sind verschiedene Arten und Unterarten von Trichinellen bekannt: T. britovi parasitiert in Luchs und Fuchs, T. nativa in Polarbär und Meeressäugern, T. nelsoni in Hyäne und Löwe und T. pseudospiralis in Vögeln und Nagern.

Adulte, geschlechtsreife Darmtrichinellen sind wenige mm lang und leben bevorzugt in der Schleimhaut des Dünndarmes. Das Weibchen setzt nach der Befruchtung laufend Larven frei, die sich durch die Darmwand bohren und über Blut- und Lymphweg in der Skelettmuskulatur des Wirtes einnisten. Diese Muskeltrichinellen stellen die infektiöse Form im Zyklus dar und bleiben in den wirtseigenen Fibrinkapseln der Muskulatur jahrelang infektiös. Mit einer Fleischmahlzeit gelangen die Muskeltrichinellen in neue Wirte, wo sie sich wiederum im Dünndarm einnisten und so den Zyklus als adulte, geschlechtsreife Stadien schließen.

Der klinische Verlauf der Erkrankung ist abhängig von der Anzahl der inkorporierten Trichinenlarven. Ab einer Aufnahme von ca. 50-70 Larven können Symptome auftreten, ab 3000 Muskeltrichinellen werden die Auswirkungen bereits bedrohlich. Als erste Symptome treten Nausea, Erbrechen, gastrointestinale Störungen mit Durchfall und leichtem Fieber auf, später Myositis mit Muskelschmerzen und -steifheit, Atem- und Schluckbeschwerden, Fieber, Lid- und Gesichtsoedem und Hautexanthem. Gefürchtete Komplikationen sind Myokarditis und Meningoenzephalitis. Sobald die eingekapselten Trichinellen ihren Stoffwechsel reduzieren, klingen die Symptome ab. Eine gewisse Leistungsbeeinträchtigung der Muskulatur sowie rheumatoide Beschwerden können jedoch dauernd bestehen bleiben.

Spezies	Erkrankung	Symptome	Infektionsmodus
Trichinella spiralis	Trichinose (Trichinellose)	abdominelle Beschwerden, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe. Mit der Aussaat der Larven kommt es zu Fieber, Gesichtsoedem, Lymphknotenschwellung, Konjunktivitis und Myalgien. Komplikationen: Myokarditis, Pneumonie, Enzephalitis und Meningitis	Genuss von rohem bzw. ungenügend gekochtem, infiziertem Fleisch (Schwein, Wild)

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- Mikroskopie, Muskelbiopsie
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels ELISA

2 VERWENDUNGSZWECK

Der DRG Trichinella spiralis IgG ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper gegen Trichinella spiralis in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3 TESTPRINZIP

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern gegen Trichinella spiralis beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Trichinella spiralis spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertes Protein A bindet an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstanden Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) - Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4 MATERIALIEN

4.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **Trichinella spiralis beschichtete Mikrotiterstreifen:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Trichinella spiralis Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Trichinella spiralis Protein A Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugiertem Protein A; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Trichinella spiralis Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Trichinella spiralis Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Trichinella spiralis Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2 Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3 Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Wascheinrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5 STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2°C - 8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20°C - 25°C) zu bringen!

6.1 Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem *Trichinella spiralis* Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2°C - 8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2°C - 8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2 *Trichinella spiralis* Protein A Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von Protein A, Meerrettich-Peroxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2°C - 8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2°C - 8°C).*

6.3 Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2°C - 8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2°C - 8°C).*

6.4 IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2°C - 8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2°C - 8°C).*

6.5 Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2°C - 8°C).*

6.6 TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2°C - 8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht bläulich. Sollte die TMB-Substratlösung nach blau umschlagen, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.*

6.7 Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2°C - 8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2°C - 8°C).*

7 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70 bis -20°C). Wiederaufgetaute 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

8.1 Testvorbereitung

Gebrauchsinformation **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 Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| 1 Vertiefung (z.B. A1) | für den Substratleerwert (Blank), |
| 1 Vertiefungen (z.B. B1) | für die Negativ Kontrolle und |
| 2 Vertiefungen (z.B. C1+D1) | für die Cut-off Kontrolle und |
| 1 Vertiefung (z.B. E1) | für die Positiv Kontrolle vorsehen |

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µl 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 \pm 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!
5. 100µl Trichinella spiralis Protein A Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20°C - 25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20°C - 25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. *Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.*
Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgG-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in DU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2 Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in **A1** den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt 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

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200** und < **cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionswerte **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **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 beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = \underline{0.38}$$

9.3 Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1 Ergebnisse in DRG-Einheiten [DU]

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

Beispiel: $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 3.2 \text{ DU (DRG Units)}$

Cut-Off:	10	DU
Grauzone:	9-11	DU
Negativ:	<9	DU
Positiv:	>11	DU

10 TESTMERKMALE

10.1 Präzision

<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>
Pos. Serum	4	0.73	5.2

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Vk (%)</u>
Pos. Serum	8	0.70	3.9

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 ist 94.8 %.

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 >95 %.

10.4 Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. 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 der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen *Toxocara canis* sind möglich.

12 SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung 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 verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet.
- Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- 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.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: *Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.*

12.1 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

La trichinella spiralis é l'agente eziologico della trichinosi, una malattia molto diffusa tra gli essere umani ed anche numerosi animali. La trichinella appartiene alla famiglia dei vermi nematodi. Sono parassiti di carnivori e onnivori che si dividono in vari sottogruppi, per esempio T. britovi nelle volpi e linci, T. nativa negli orsi polare e nei mammiferi marini, T. nelsoni nei leoni e nelle iene e T. pseudospiralis negli uccelli e nei roditori.

Le trichinelle adulte e fertili vivono preferibilmente nella mucosa dell'intestino tenue. La femmina rilascia continuamente una grande quantità di larve. Queste perforano la parete intestinale e si diffondono per via ematica o linfatica. Infine si insediano in cisti localizzate nei muscoli dove possono vivere per anni e rappresentano la forma contagiosa. L'uomo contrae la trichinosi mangiando carne malcotta infestata dalle cisti larvali del parassita. Il quadro clinico dipende dal numero delle larvi incorporati. I sintomi in genere iniziano da un numero di 50-70 larve circa. Con più di 3000 larve la malattia può diventare pericolosa. I primi sintomi in genere sono nausea, vomito, diarrea e febbre non molto alta. Questi sintomi possono essere seguiti da dolore e irrigidimento muscolare, miosite, edemi nel viso e esantema della pelle. Complicazioni pericolose sono la miocardite e la meningoencefalite. I sintomi diminuiscono nel momento in cui le trichinelle rallentano il loro metabolismo.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
Trichinella spiralis	Trichinosi	nausea, vomito, diarrea, febbre, dolore e irrigidimento muscolare, miosite, edemi nel viso, esantema della pelle Complicanze: miocardite, meningoencefalite	Trasmissione: orale; contatto con feci contaminati cibi poco cotti o carni crude

Diagnosi

- Microscopia: Biopsia
- Sierologia: ELISA

2 USO PREVISTO

Il DRG Trichinella spiralis IgG ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per Trichinella spiralis nel siero o plasma (citrato) umano.

3 PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgG per Trichinella spiralis si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici della Trichinella spiralis. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli Proteina A del coniugato (perossidasi di rafano- Proteina A) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la Trichinella spiralis di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4 MATERIALI

4.1 Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni della Trichinella spiralis (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigeni della Trichinella spiralis; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 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 concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato Proteina A Trichinella spiralis**:** 1 flacone contenente 20 ml di Proteina A, coniugati a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- **Trichinella spiralis IgG Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- **Trichinella spiralis IgG Controllo Cut-off***:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- **Trichinella spiralis IgG Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3 Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1 Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati della *Trichinella spiralis*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2 Coniugato Proteina A *Trichinella spiralis*

Il flacone contiene 20 ml di Proteina A coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C*

6.3 Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4 Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5 Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6 Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7 Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (citrato) umano.

Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70°C a -20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.*

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 diluente IgG.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8 PROCEDIMENTO

8.1 Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

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

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed 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 almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.
Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.
5. Pipettare 100 µl di Coniugato Proteina A Trichinella spiralis in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$). Non esporre a fonti di luce diretta.**
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*
Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1+100 con tampone diluente IgG. Il risultato DU viene moltiplicato per due.
11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2 Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

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

9 RISULTATI

9.1 Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e < cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza >**Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non é valido e deve essere ripetuto.

9.2 Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38

$$\text{Cut-Off} = \underline{0.38}$$

9.3 Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1 Risultati in unità DRG [DU]

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

Esempio: $\frac{1.204 \times 10}{0.38} = 32 \text{ DU (DRG Units)}$

Cut-Off :	10	DU
Dubbio:	9-11	DU
Negativo:	<9	DU
Positivo:	>11	DU

10 CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1 Precisione

Interdosaggio	n	Media	Cv (%)
Siero pos.	4	0.73	5.2

Intradosaggio	n	Media	CV (%)
Siero pos.	8	0.70	3.9

10.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a 94.8 %.

10.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >95 %.

10.4 Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

11 LIMITAZIONI

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

Reazioni incrociate con anticorpi contro *Toxocara canis* sono possibili.

12 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza 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 componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- 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.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1 Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

1 INTRODUCCIÓN

La *Trichinella spiralis* es el agente patógeno de la triquinosis, un nemátodo de manifestación mundial en el humano y varios animales. Son parásitos del tejido de mamíferos carnívoros y omnívoros incluyendo al hombre. Se conocen varios subtipos: *T. britovi* que parasita en el zorro y el lince, *T. nativa* en el oso polar y los mamíferos marinos, *T. nelsoni* en el león y la hiena y *T. pseudospiralis* en las aves y los roedores.

Las *Trichinellas* adultas sólo miden unos mm y viven preferentemente en la mucosa del intestino delgado. La hembra segrega a menudo larvas después de su fecundación que migran a través de la pared intestinal y el torrente sanguíneo al tejido muscular, donde forman quistes. Estos quistes presentan la forma infecciosa del ciclo de vida y son infecciosos por varios años dentro de las propias cápsulas de fibrina del huésped. La enfermedad se transmite al comer la carne infectada donde se anidan de nuevo en la mucosa intestinal para cerrar el ciclo como estados adultos y maduros.

El curso clínico de la enfermedad depende del número de larvas incorporadas. Con un número de aprox. 50 a 70 larvas se pueden mostrar síntomas como náusea, vómito, dificultades respiratorias y dificultad de deglución, fiebre, edemas de la cara y exantemas de la piel. Complicaciones temidas son miocarditis y meningoencefalitis. A menudo cuando las *Trichinellas* reducen su metabolismo, desaparecen los síntomas. Sin embargo pueden persistir una deficiencia muscular y molestias reumáticas.

Especies	Vía de transmisión	Síntomas	Vía de transmisión
<i>Trichinella spiralis</i>	Triquinosis (triquinelosis)	Trastornos abdominales, náuseas, vómitos, diarrea. Cuando las larvas se disgregan aparece fiebre, edemas de la cara, linfadenitis, conjuntivitis y mialgias. Complicaciones: miocarditis, neumonía, encefalitis y meningitis	Consumo de carne infectada (porcino, salvaje) cruda o no bien cocida

Las infecciones pueden ser detectadas por:

- Microscopía, biopsia muscular
- Serología: Detección de anticuerpos a través de ELISA

2 USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzimático de DRG es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Trichinella spiralis* en suero o plasma (citrato) humano.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* se basa en la técnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de *Trichinella spiralis* abortus. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de proteína A con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgG) recubiertas de antígeno de Trichinella spiralis:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Trichinella spiralis, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgG de la muestra***:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)*:** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado de proteína A (Trichinella spiralis)**:** 1 botella de 20ml de conjugado proteína A con peroxidasa; color azul; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgG (Borrelia burgdorferi)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgG (Borrelia burgdorferi)***:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado
- **Control negativo de IgG (Borrelia burgdorferi)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

* contiene 0.1% Bronidox L después de diluir

** contiene 0.2% Bronidox L

*** contiene 0.1% Catón

4.2 Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3 Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5 ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2°C - 8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20°C - 25°C) antes de ser utilizados!

6.1 Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de *Trichinella spiralis* están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2°C - 8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2°C - 8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2 Conjugado de proteína A (*Trichinella spiralis*)

La botella contiene 20ml de una solución de proteína A conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante azul inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2°C - 8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2°C - 8°C.*

6.3 Controles

Las botellas contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2°C - 8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2°C - 8°C.*

6.4 Tampón de dilución de IgG para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2°C - 8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2°C - 8°C.*

6.5 Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2°C - 8°C.*

6.6 Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2°C - 8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7 Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2°C - 8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2°C - 8°C.*

7 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano.

Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2°C - 8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-70°C a -20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1 Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en realación **1+100** con el tampón de dilución para la muestra de IgG, p.e. 10 µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA elevar el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. E1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

- Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
- Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
- Incubar 1 h \pm 5 min a 37°C.**
- Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el resto del líquido de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Ojo: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!
- Pipetar 100µl de conjugado de proteína A (Trichinella spiralis) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
- Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20°C - 25°C).** Evitar la luz solar directa.
- Repetir el lavado como en el paso número 4.
- Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
- Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20°C - 25°C).**
- Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*
Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgG 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.
- Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2 Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular el **promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9 CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1 Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción >**cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2 Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0.43

$$\text{Cut-off} = \underline{0.43}$$

9.3 Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1 Resultados en unidades DRG [DU]

$$\frac{\text{Promedio de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{DRG-unidades} = \text{DU}]$$

$$\text{Ejemplo: } \frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ DU (DRG unidades)}$$

Cut-Off:	10	DU
Zona intermedia:	9-11	DU
Negativo:	<9	DU
Positivo:	>11	DU

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

Inter ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	4	0.73	5.2

Intra ensayo	n	Promedio	CV (%)
Serum pos.	8	0.70	3.9

10.2 Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de 94.8 %.

10.3 Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de >95%.

10.4 Interferencias

Las muestras hemolíticas, lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 10 mg/ml para hemoglobina, 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos quebrales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11 LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

Reacciones cruzadas con anticuerpos contra *Toxocara canis* son posibles.

12 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: *El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.*

12.1 Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13 BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Despommier, D.: Trichinellosis. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases, Vol. 1, Helminthic Diseases. Ed. Walls and Schantz. Academic Press, 1986, pp. 163-181.
2. Krogstad, D., Visvesvara, G., Walls, R., Smith, J.: Tissue Helminths. Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1985, pp 654.
3. Kagan, I.: Serodiagnosis of Parasitic Diseases. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd Ed.. American Society for Microbiology, Washington, DC., 1986, pp. 474-477.
4. Petri, W. et al.: Common-Source Outbreak of Trichinosis Associated with Eating Raw Home-Butchered Pork. So Medical J, August 1988, pp. 1056-1058.
5. Oliver, D. et al.: Enzyme Linked Immunoassay for Detection of Trichinosis in Humans. Proc 7th Int Conf on Trich, Oct. 1988.
6. Ivanoska, D. et al.: Comparative Efficacy of Antigen and Antibody Detection Tests for Human Trichinellosis. J Parasit, Vol 75#1, 1989, pp. 38-41.











14 SCHEME OF THE ASSAY**Test Preparation**

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità
MTP	Microplate	Mikrotiterplatte	Microplaque	Microplaca	Micropiastra
CONJ	Conjugate	Konjugat	Conjugué	Conjugado	Coniugato
CONTROL -	Control serum, negative	Kontrollserum, negative	Sérum de contrôle négatif	Suero control negativo	siero di controllo, negativo
CONTROL +	Control serum, positive	Kontrollserum, positiv	Sérum de contrôle positif	Suero de control positivo	siero di controllo, positivo
CUT OFF	Cut off control serum	Cut off Kontrollserum	Sérum de contrôle du cut-off	Suero control Cut-off	siero di controllo, cut-off
DIL G	Sample diluent buffer IgG	IgG-Probenverdünnungspuffer	Tampon diluant pour échantillon IgG	soluzione solución tampón para muestras IgG	tampone per i campioni IgG
SOLN STOP	Stop solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Substrat TMB	solción substrato TMB	soluzione substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated	Waschlösung 20x konzentriert	Solution de lavage concentré 20 x	solución de lavado concentrado x20	soluzione di lavaggio concentrazione x20