



Instructions for Use

Filariasis ELISA

IVD



REF EIA-5972

Σ 96


DRG Instruments GmbH, Germany

Distributed by:


DRG International, Inc., USA

**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.
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o 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	5
7	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	5
8	ASSAY PROCEDURE	6
9	RESULTS.....	7
10	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
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	13
11	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	14
12	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	14
1	INTRODUZIONE.....	15
2	USO PREVISTO	15
3	PRINCIPIO DEL TEST	15
4	MATERIALI	16
5	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE	16
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	17
7	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	17
8	PROCEDIMENTO	18
9	RISULTATI.....	19
10	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	19
11	LIMITAZIONI	20
12	PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....	20

1	INTRODUCCIÓN	21
2	USO PREVISTO	21
3	PRINCIPIO DEL ENSAYO	21
4	MATERIALES.....	22
5	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE.....	22
6	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	23
7	TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	23
8	PROCEDIMIENTO.....	24
9	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	25
10	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	25
11	LIMITACIONES DEL ENSAYO.....	26
12	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	26
13	BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA	27
14	SCHEME OF THE ASSAY	28
	SYMBOLS USED.....	29

1 INTRODUCTION

Filariasis (or philariasis) is a parasitic disease caused by an infection with roundworms of the Filarioidea type. These are spread by blood-feeding black flies and mosquitoes. This disease belongs to the group of diseases called helminthiases. Eight known filarial nematodes use humans as their definitive hosts. These are divided into three groups according to the niche within the body they occupy:

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Brugia malayi</i> , and <i>Brugia timori</i>	Lymphatic filariasis	Recurring lymphadenitis, Fever, Disfigurement of the limbs (elephantiasis) and genitalia (hydroceles and other anatomical changes in the male genitalia) by worms occupying the lymphatic system	Mosquito vectors include <i>Mansonia</i> , <i>Anopheles</i> , and <i>Aedes</i> mosquitoes
<i>Loa loa</i> (the eye worm), <i>Mansonella streptocerca</i> , and <i>Onchocerca volvulus</i>	Subcutaneous filariasis (Loiasis; Streptocerciasis; Onchocerciasis)	Calabar swellings (transient localized angioedema) and subconjunctival migration of the worm (eye worm); chronic, pruritic dermatitis and lymphadenopathy; dermatitis, keratitis, chorioretinitis, blindness (river blindness)	Female black fly of the genus <i>Simulium</i>
<i>Mansonella perstans</i> and <i>Mansonella ozzardi</i>	Serous cavity filariasis (Perstans filariasis)	transient angioedema, pruritus of arms, face and other parts of the body, fever, headache, arthralgias; <i>M. ozzardi</i> infections are usually asymptomatic	Blood-sucking flies called midges (<i>Culicoides grahamsi</i> and <i>C. austeni</i>)

The adult worms, which usually stay in one tissue, release early larval forms known as microfilariae into the host's bloodstream. These circulating microfilariae can be taken up with a blood meal by the arthropod vector; in the vector, they develop into infective larvae that can be transmitted to a new host.

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Microscopy
- PCR
- Serology: e.g. ELISA

2 INTENDED USE

The Filariasis ELISA is intended for the qualitative determination of specific antibodies against filariae in human serum or plasma (citrate or 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 filarial 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/G; coloured blue, ready to use; black cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **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 filarial 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 Sample Dilution Buffer.

Dispense 10 µL sample and 1 mL 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 µL to 350 µL 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 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL 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 ± 5 min at 37 °C ± 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 µL 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 µL 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 µL 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 µL 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: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ DU (Units)}$

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

<u>Intra-assay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (E)</u>	<u>CV (%)</u>
#1	12	0.435	2.07
#2	12	0.334	3.13
#3	12	0.143	3.97

<u>Inter-assay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (DU)</u>	<u>CV (%)</u>
#1	10	11.85	1.81
#2	10	9.45	2.67
#3	10	11.91	2.60

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 99.1% (95% confidence interval: 94.99% - 99.98%).

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 94.7% (95% confidence interval: 82.25% - 99.36%).

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

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters revealed only minimal cross-reactivity to *Fasciola* specimens.

However, in endemic areas, double infection as well as past infection with other parasites and worms should be considered.

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.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- 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

Filariose ist eine parasitäre, durch eine Infektion mit Spulwürmern (Filarioidea) verursachte Erkrankung. Diese wird durch blutsaugende schwarze Fliegen und Mücken verbreitet. Die Krankheit gehört zu der Gruppe der Helminthiosen.

Bei acht bekannten Filarien fungiert der Mensch als ihr endgültiger Wirt. Diese unterteilen sich in drei Gruppen abhängig vom betroffenen Körperorgan:

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
Wuchereria bancrofti, Brugia malayi und Brugia timori	Lymphatische Filariose	Wiederkehrende Lymphadenitis, Fieber, abnorme Vergrößerung von Körperteilen (Elephantiasis) und der Genitalien (Hydrozele und andere anatomische Veränderungen der männlichen Genitalien) durch Wurmbefall im Lymphsystem	Mosquito Vektoren wie Mansonia, Anopheles und Aedes Moskitos
Loa loa (Augenwurm), Mansonella streptocerca und Onchocerca volvulus	Subkutane Filariose (Loiasis; Streptocerciasis; Onchozerkose)	Calabar-Schwellung (transiente lokale Angioödeme) und subkonjunktivale Migration der Würmer (Augenwurm); Chronische, juckende Dermatitis und Lymphadenopathie; Dermatitis, Keratitis, Chorioretinitis, Blindheit (Flussblindheit)	Weibliche schwarze Fliege der Gattung Simulium
Mansonella perstans und Mansonella ozzardi	Mansonelliasis (Perstans filariasis)	Transiente Angioödeme, Juckreiz (Pruritus) an Armen, im Gesicht und an anderen Körperstellen, Fieber, Kopfschmerzen, Gelenkschmerzen; Infektionen mit M. ozzardi verlaufen i.d.R. symptomlos	Blutsaugende Gnitzen (Culicoides grahami und C. austeni)

Die adulten Würmer, die in der Regel in einem Gewebe bleiben, geben Larven (Mikrofilarien) in das Blut des Wirtes ab. Diese zirkulierenden Mikrofilarien können durch den Arthropoden Vektor bei einer Blutmahlzeit aufgenommen werden; im Vektor entwickeln sie sich zu infektiösen Larven, die auf einen neuen Wirt übertragen werden können.

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie
- PCR
- Serologie: z.B. ELISA

2 VERWENDUNGSZWECK

Der Filariasis ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer Antikörper gegen Filarien in humanem Serum oder Plasma (Zitrat oder 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 Filarien Antigenen in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **Probenverdünnungspuffer:**
1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 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 Phosphatpuffer (0,2 M) zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **Konjugat:**
1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugiertem Protein A/G; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **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. ; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **Cut-off Kontrolle:**
1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:**
1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 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
- 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 Filarien-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 Probenverdünnungspuffer verdünnen,

z. B. 10 µL Probe und 1 mL 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 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 °C ± 1 °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 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 Sekunden 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.
Grauzone	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 innerhalb der Grauzone, 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	12	0,435	2,07
#2	12	0,334	3,13
#3	12	0,143	3,97
Inter-Assay	n	Mittelwert (DU)	Vk (%)
#1	10	11,85	1,81
#2	10	9,45	2,67
#3	10	11,91	2,60

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 liegt bei 99,1 % (95% Konfidenzintervall: 94,99% - 99,98%).

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 liegt bei 94,7 % (95% Konfidenzintervall: 82,25% - 99,36%).

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

Untersuchungen eines Probenkollektivs mit Antikörper-Reaktivität gegenüber potentiell kreuzreaktiven Parametern zeigten lediglich minimale Kreuzreaktionen gegenüber *Fasciola* positiven Proben.

In endemischen Gebieten sollten immer sowohl Doppelinfektionen als auch vorangegangene Infektionen mit anderen Würmern und Parasiten in Betracht gezogen 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



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

Filariosi è una malattia parassitaria causata da una infezione per nematodi del tipo Filarioidea. Questi sono diffusi da mosche e zanzare nere di sangue al seno. Questa malattia appartiene al gruppo di malattie chiamato elmintiasi. Otto noti nematodi filarial usano gli esseri umani come loro ospiti definitivi. Questi sono divisi in tre gruppi in base alla nicchia all'interno del corpo che occupano:

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, and Brugia timori	Lymphatic filariasis	linfoadenite ricorrente, febbre, Disfigurement degli arti (elefantiasi) e dei genitali (idroceli e altre variazioni anatomiche del genitali maschili) da vermi che occupa il sistema linfatico	Zanzare vettori: Mansonia, Anopheles, e zanzare Aedes grahami e C. austeni
Loa loa ("verme dell'occhio"), Mansonella streptocerca, e Onchocerca volvulus	Subcutaneous filariasis (Loiasis; Streptocerciasis; Onchocerciasis)	Rigonfiamenti Calabar (angioedema transitoria localizzata) e la migrazione subconjunctival del verm (verme occhio); croniche, dermatiti pruriginose e linfoadenopatia; dermatiti, cheratite, corioretinite, cecità (cecità fluviale)	Vettori: mosche nere (genere Simuliidae)
Mansonella perstans e Mansonella ozzardi	Serous cavity filariasis	Angioedema transitoria, prurito delle braccia, viso e altre parti del corpo, febbre, cefalea, artralgie; L'infezioni ozzardi M. sono di solito asintomatica	Mosche del genere Culicoides (Culicoides grahami y C. austeni)

I vermi adulti, qui di solito soggiornare in un tessuto, rilasciano le larvali prime, microfilarie, nel sangue dell'ospite. Questi microfilarie circolanti può essere assunto con un pasto di sangue da parte del vettore di artropodi; nel vettore, in larve infettive si sviluppano che possono essere trasmessi ad un nuovo ospite.

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

- Microscopia
- PCR
- Sierologia: ELISA

2 USO PREVISTO

Il Filariasis ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici anti Filaria nel siero o plasma (citrate, 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 rivestiti 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 di Piastre di Microtitolazione ELISA.

4 MATERIALI

4.1 Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:**
12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della Filaria; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone di Diluizione del Campione:**
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 proteina A/G coniugati a perossidasi; colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Soluzione SubstratoTMB:**
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 divisibile sono rivestiti con l'antigeni della Filaria.

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

Usare per queste teste campioni di siero o plasma (citrato, 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.

Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL di Tampone di Diluizione del Campione 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 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 > 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 per le Piastre di Microtitolazione a zero usando il Bianco-substrato, il valore de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'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 equivoco 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	12	0,435	2,07
#2	12	0,334	3,13
#3	12	0,143	3,97

Inter-dosaggio	n	Media (DU)	CV (%)
#1	10	11,85	1,81
#2	10	9,45	2,67
#3	10	11,91	2,60

10.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analiti specifici. La specificità diagnostica è 99,1 % (95% intervallo di confidenza: 94,99% - 99,98%).

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 94,7 % (95% intervallo di confidenza: 82,25% - 99,36%).

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 incrociata

L'investigazione di un gruppo di campioni con potenziale reattività crociata ha rivelato reazione crociata minima agli esemplari Fasciola.

Tuttavia, in aree endemiche, una doppia infezione così come l'infezione passata con altri parassiti e vermi devono essere considerati.

11 LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono 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 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 è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

1 INTRODUCCIÓN

La filariasis (o philariasis) es una enfermedad parasitaria causada por una infección con lombrices de tipo Filarioidea. Estos se propagan por la sangre de las moscas negras y los mosquitos. Esta enfermedad pertenece al grupo de enfermedades llamadas helmintiasis.

Ocho nemátodos filarios conocidos usan a los humanos como sus anfitriones definitivos. Estos se dividen en tres grupos según el nicho dentro del cuerpo que ocupan:

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, and Brugia timori	Lymphatic filariasis	Linfadenitis recurrente, fiebre, desfiguración de los miembros (elefantiasis) y genitales (hidroceles y otros cambios anatómicos en los genitales masculinos) por gusanos que ocupan el sistema linfático	Los vectores del mosquito incluyen mosquitos de Mansonia, de Anopheles, y de Aedes
Loa loa (the eye worm), Mansonella streptocerca, and Onchocerca volvulus	Subcutaneous filariasis (Loiasis; Streptocerciasis; Onchocerciasis)	Hinchazones de calabar (angioedema localizado transitorio) y migración subconjuntival del gusano (gusano del ojo); Crónica, dermatitis prurítica y linfadenopatía; Dermatitis, queratitis, coriorretinitis, ceguera (ceguera de los ríos)	Mosca negra femenina del género Simuliidae
Mansonella perstans and Mansonella ozzardi	Serous cavity filariasis (Perstans filariasis)	Angioedema transitorio, prurito de los brazos, cara y otras partes del cuerpo, fiebre, dolor de cabeza, artralgias; Las infecciones por M. ozzardi suelen ser asimétricas	Las moscas aspiradoras de sangre del género Culicoides (Culicoides grahami y C. austeni)

Los gusanos adultos, que generalmente permanecen en un tejido, liberan formas larvianas tempranas conocidas como microfilarias en el torrente sanguíneo del huésped. Estas microfilarias circulantes pueden ser absorbidas con una harina de sangre por el vector artrópodo; En el vector, se convierten en larvas infecciosas que pueden ser transmitidas a un nuevo huésped.

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Microscopía
- PCR
- Serología: ELISA

2 USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima Filariasis ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos específicos contra Filariasis en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4 MATERIALES

4.1 Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:**
12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Filarial, en bolsa de aluminio.
- **Tampón de Dilución de Muestra:**
1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de parada:**
1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de Lavado (20x conc.):**
1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
- **Conjugado:**
1 botella de 20 mL de conjugado de proteína A/G con peroxidasa; color azul; tapa negra; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Solución de Sustrato de TMB:**
1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); $< 0,1 \%$; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control Positivo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:**
1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
- **Control Negativo:**
1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2 Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3 Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10 - 1000 μ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5 ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2 °C - 8 °C.

Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2 °C - 8 °C.

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1 Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno Filarial.

Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2 °C - 8 °C.

6.2 Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada.

El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3 Solución de Sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2 °C - 8 °C, protegida de la luz.

La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

7 TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano.

Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2 °C - 8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-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 relación **1 + 100** con el Tampón de Dilución de Muestra, p. e. 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestra, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8 PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

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

Graduar la incubadora a 37 °C ± 1 °C.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos.
Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h ± 5 min a 37 °C ± 1 °C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL del Tampón de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20 °C - 25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100 µL de la solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con la Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.1 Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el esquema de la placa.

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

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

9 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1 Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control Negativo:** valor de la extinción < **0,200 y < Cut-off**
- **Control Cut-off::** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control Positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

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

9.2 Cálculo del valor de la medición

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

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86:2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

9.2.1 Resultados en unidades [DU]

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

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

9.3 Interpretación de los resultados

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 DU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es equívoca de nuevo la muestra se considera como negativo .
Negativo	< 9 DU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
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 pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto DRG.

10.1 Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	12	0,435	2,07
#2	12	0,334	3,13
#3	12	0,143	3,97

Inter ensayo	n	Promedio (DU)	CV (%)
#1	10	11,85	1,81
#2	10	9,45	2,67
#3	10	11,91	2,60

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 del analítico específico. Es de 99,1 % (95% intervalo de confianza: 94,99% - 99,98%).

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 94,7 % (95% intervalo de confianza: 82,25% - 99,36%).

10.4 Interferencias

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

10.5 Reactividad cruzada

La investigación de un panel de muestra con actividades de anticuerpos para potencial reacción cruzada reveló una reactividad cruzada mínima a los especímenes de Fasciola.

Sin embargo, en las zonas endémicas, se debe considerar la infección doble, así como la infección pasada con otros parásitos y gusanos.

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.


12 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- 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 diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación 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 contaminación cruzada.
- 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.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1 Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

 Atención	H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	P261	Evitar respirar el aerosol.
	P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
	P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
	P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2 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 / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Alli, R.; Kulkarni, S.; Reddy, M. V.; Harinath, B. C. (2001): Evaluation of sevafilachek immunoassays and rapid ICT-filariasis test for detection of bancroftian filariasis. In *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 16 (2), pp. 207–210. DOI: 10.1007/BF02864863.
2. Burbelo, Peter D.; Ramanathan, Roshan; Klion, Amy D.; Iadarola, Michael J.; Nutman, Thomas B. (2008): Rapid, novel, specific, high-throughput assay for diagnosis of Loa loa infection. In *Journal of Clinical Microbiology* 46 (7), pp. 2298–2304. DOI: 10.1128/JCM.00490-08.
3. Chen, Jun-Hu; Wang, Hen; Chen, Jia-Xu; Bergquist, Robert; Tanner, Marcel; Utzinger, Jurg; Zhou, Xiao-Nong (2012): Frontiers of parasitology research in the People's Republic of China: infection, diagnosis, protection and surveillance. In *Parasites & vectors* 5, p. 221. DOI: 10.1186/1756-3305-5-221.
4. Cuello, M. Rivera; Cuadros, E. Nunez; Claros, A. Medina; Hortelano, M. Garcia; Fontelos, P. Martin; Pena, M. J. Mellado (2009): Filariasis en pacientes procedentes de area endemica. Presentacion de una serie de 14 casos. In *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)* 71 (3), pp. 189–195. DOI: 10.1016/j.anpedi.2009.04.022.
5. Freedman, David O. (2006): Onchocerciasis. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 1176–1188.
6. Hotez, Peter J.; Bottazzi, Maria Elena; Strych, Ulrich; Chang, Li-Yen; Lim, Yvonne A. L.; Goodenow, Maureen M.; AbuBakar, Sazaly (2015): Neglected tropical diseases among the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN): overview and update. In *PLoS neglected tropical diseases* 9 (4), e0003575. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003575.
7. Joseph, Hayley M.; Melrose, Wayne (2010): Applicability of the Filter Paper Technique for Detection of Antifilarial IgG(4) Antibodies Using the Bm14 Filariasis CELISA. In *Journal of parasitology research* 2010. DOI: 10.1155/2010/594687.
8. Klion, Amy D.; Nutman, Thomas B. (2006): Loiasis and Mansonella Infections. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 1163–1175.
9. Kyelem, Dominique; Fischer, Peter U.; Brattig, Norbert W. (2011): The diagnostics and control of neglected tropical helminth diseases. Foreword. In *Acta tropica* 120 Suppl 1, S1-3. DOI: 10.1016/j.actatropica.2011.04.001.
10. Lloyd, Melanie M.; Gilbert, Rebecca; Taha, Nathalie Tebao; Weil, Gary J.; Meite, Aboulaye; Kouakou, Ilunga M. M.; Fischer, Peter U. (2015): Conventional parasitology and DNA-based diagnostic methods for onchocerciasis elimination programmes. In *Acta tropica* 146, pp. 114–118. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.03.019.
11. Nutman, Thomas B.; Kazura, James W. (2006): Filariasis. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 1152–1162.
12. Rebollo, Maria P.; Bockarie, Moses J. (2013): Rapid diagnostics for the endgame in lymphatic filariasis elimination. In *The American journal of tropical medicine and hygiene* 89 (1), pp. 3–4. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0202.
13. Steel, Cathy; Golden, Allison; Stevens, Eric; Yokobe, Lindsay; Domingo, Gonzalo J.; los Santos, Tala de; Nutman, Thomas B. (2015): Rapid Point-of-Contact Tool for Mapping and Integrated Surveillance of Wuchereria bancrofti and Onchocerca volvulus Infection. In *Clinical and vaccine immunology : CVI* 22 (8), pp. 896–901. DOI: 10.1128/CVI.00227-15.
14. Tambo, Ernest; Ai, Lin; Zhou, Xia; Chen, Jun-Hu; Hu, Wei; Bergquist, Robert et al. (2014): Surveillance-response systems: the key to elimination of tropical diseases. In *Infectious diseases of poverty* 3, p. 17. DOI: 10.1186/2049-9957-3-17.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES

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 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	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 *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo 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 conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	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