

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Toxoplasma vet ELISA

RUO

REF

DETOXVT0460



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS

1.	INTENDED USE	3
2.	PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
3.	MATERIALS	3
4.	STABILITY AND STORAGE	4
5.	REAGENT PREPARATION	4
6.	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION	4
7.	ASSAY PROCEDURE	5
8.	RESULTS	5
9.	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS	7
10.	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	7
11.	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
	ABBREVIATIONS	8
	SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE	9
1.	USO PREVISTO	10
2.	PRINCIPIO DEL ENSAYO	10
3.	MATERIALES	10
4.	ESTABILIDAD Y ALMACENAJE	11
5.	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	11
6.	TOMA Y PRAPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	11
7.	PROCEDIMIENTO	12
8.	CALCULO DE LOS RESULTADOS	12
9.	PERFORMANCES DU TEST	13
10.	LIMITACIONES DEL ENSAYO	14
11.	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	14
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Toxoplasma vet ELISA is intended for the quantitative determination of specific IgG antibodies against Toxoplasma gondii in serum samples from cats and dogs.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative 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.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- 1) **SORB** **MIT** **Microtiterplate**: 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with Toxoplasma gondii antigens; in resealable aluminium foil.
- 2) **SAM** **DIL** **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).
- 3) **STOP** **SOLN** **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- 4) **WASH** **SOLN** **20x** **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. 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- 5) **ENZ** **CONJ** **Conjugate**: 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled Protein A/G; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- 6) **SUB** **TMB** **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- 7) **CAL** **A – D** **Standards**: 4 vials, each containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.

Standard A:	0	IU/ml; blue cap
Standard B:	50	IU/ml; green cap
Standard C:	100	IU/ml; yellow cap
Standard D:	200	IU/ml; red cap

The standards are calibrated in accordance with the 3rd International Standard of the WHO.

For hazard and precautionary statements see 11.1

3.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

3.3. 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 Microtiterplate wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. STABILITY AND STORAGE

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

5. REAGENT PREPARATION

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

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Toxoplasma gondii* 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...8 °C.

5.2. 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...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.

5.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...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.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use serum samples from cats and dogs with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-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.

6.1. 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.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions 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 to five and the volume of Washing Buffer from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. 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 ± 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 \pm 5 min at 37 ± 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 sec. 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...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...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.

7.1. 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. Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended. Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay 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
- **Standard A:** Absorbance value < 0.200
- **Standard B:** Absorbance value > 0.300
- **Standard C:** Absorbance value > 0.500
- **Standard D:** Absorbance value > 1.000

Standard A $<$ Standard B $<$ Standard C $<$ Standard D

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

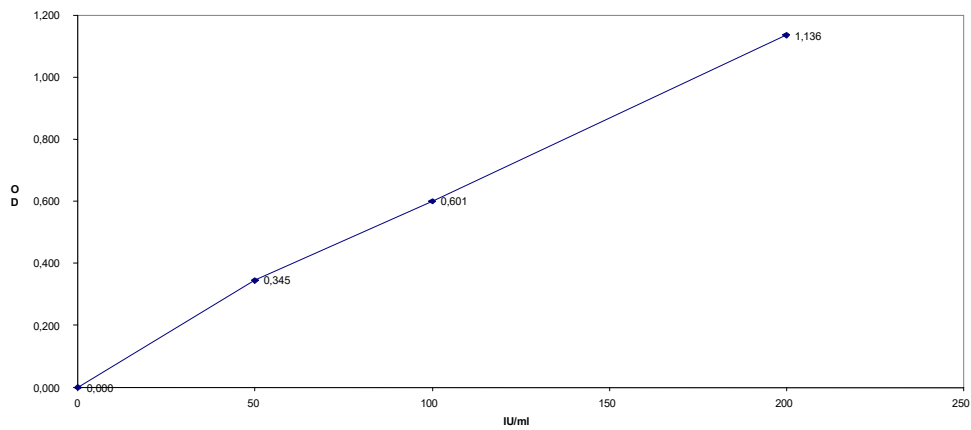
8.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in IU/ml** plot the (mean) absorbance values of the 4 Standards A, B, C and D on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0, 50, 100 and 200 IU/ml) and draw a standard curve (absorbance values on the y-axis, concentrations on the x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each samples.

For the calculation of the standard-curve mathematical Point to Point function should be used.

8.3 Typical standard Curve



8.4. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own sample populations in the geographical areas serviced.

The following values should be considered as a guideline:

Positive	> 55 IU/ml	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen.
Equivocal	50 – 55 IU/ml	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.
Negative	< 50 IU/ml	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen is unlikely.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. The performance data have been established with serum samples from cats and dogs.

9.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.575	2.23
#2	24	1.218	2.18
#3	24	1.056	3.23

Interassay	n	Mean (IU/ml)	CV (%)
#1	12	43.61	9.97
#2	12	8.54	11.47
#3	12	118.07	5.54

9.2. Relative Specificity

The relative specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte (relative to the results of other serological tests).

Relative Specificity cats:	> 98 %	(95 % confidence interval: 80.49 % - 100 %)
Relative Specificity dogs:	91.18 %	(95 % confidence interval: 76.32 % - 100 %)

9.3. Relative Sensitivity

The relative sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte (relative to the results of other serological tests).

Relative Sensitivity cats:	> 98 %	(95 % confidence interval: 87.23 % - 100 %)
Relative Sensitivity dogs:	90.32 %	(95 % confidence interval: 74.25 % - 100 %)

9.4. 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.

9.5. Cross Reactivity

Cross reactions cannot be excluded.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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


11. 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 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 samples.
- Only for research 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 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 standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1 Safety note for reagents containing hazardous substances


Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).

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 clothing and wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	Warning	H315	Causes skin irritation.
		H319	Causes serious eye irritation.
		P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
		P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
		P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
		P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. 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.

ABBREVIATIONS

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

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE**SCHEME OF THE ASSAY**

Toxoplasma vet ELISA

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Sample (diluted 1+100)
Standard A	-	100µl	-	-	-	-
Standard B	-	-	100µl	-	-	-
Standard C	-	-	-	100µl	-	-
Standard D	-	-	-	-	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 Buffer						
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300µl of Washing Buffer						
TMB Substrate solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25°C) in the dark						
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)						

1. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático de Toxoplasma ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de IgG anticuerpos específicos contra Toxoplasma gondii en muestras de suero de gatos y perros.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cuantitativa 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 unido, 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 visualizó 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.

3. MATERIALES

3.1 Reactivos suministrados

- 1) **SORB MIT Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Toxoplasma gondii, en bolsa de aluminio.
- 2) **SAM DIL Tampón de Dilución de Muestras:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- 3) **STOP SOLN Solución de Parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- 4) **WASH SOLN 20x 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 ± 0,2; tapa blanca. 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- 5) **ENZ CONJ Conjugado:** 1 botella de 20 ml Proteína A/G conjugada con peroxidasa de rábano (HRP); color amarillo; tapa blanca; listo para ser utilizado; ≤ 0.02 % (v/v) MIT.
- 6) **SUB TMB Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- 7) **CAL A - D Estándares:** 4 botellas de 2 ml, color amarillo; listas para ser utilizadas; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Estándar A:	0	IU/ml; tapa azul
Estándar B:	50	IU/ml; tapa verde
Estándar C:	100	IU/ml; tapa amarilla
Estándar D:	200	IU/ml; tapa roja

Les étalons sont calibrés conformément au 3. Standard international de l'OMS.

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2 Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3 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 µl)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

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

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

5.1 Placa de Microtitulación

As tiras rompibles están recubiertas con antígeno de *Toxoplasma gondii*. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita di dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

5.2 Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir la Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 ml de la Tampón de Lavado + 190 ml de agua destilada. La Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente o a 2...8 °C. Caso aparecen cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3 Solución de Sustrato de TMB

La solución está listo para su uso y debe almacenarse a 2...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 utilizada en el ensayo.

6. TOMA Y PRAPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero de gatos y perros con este ensayo. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicotadas y almacenadas congeladas (-70...-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.

6.1 Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras, por ejemplo 10 µl de la muestra con 1 ml de Tampón de Dilución de Muestras, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. 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 lavado de 3 a 5 veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µl a 350 µl para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble). Usar la cantidad necesaria de tiras o pozos 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 $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

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 \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µl de la 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. Pipetar 100 µl de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µl de la Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** 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.

7.1 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 esto 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.

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.

8. CALCULO DE LOS RESULTADOS

8.1 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 $< 0,100$
- **Estándar A:** valor de la extinción $< 0,200$
- **Estándar B:** valor de la extinción $> 0,300$
- **Estándar C:** valor de la extinción $> 0,500$
- **Estándar D:** valor de la extinción $> 1,000$

Estándar A < Estándar B < Estándar C < Estándar D

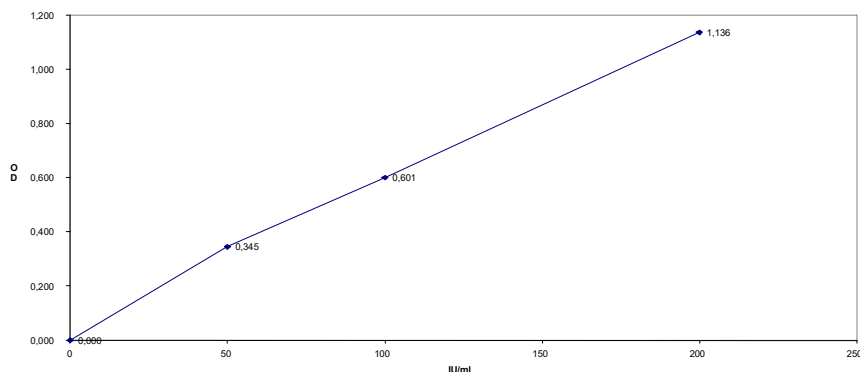
Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

8.2 Cálculo del valor de la medición

Para obtener resultados cuantitativos en IU/ml se tiene que establecer una curva estándar con los valores de extinción (eje y) de los 4 estándares A, B, C y D contra sus respectivas concentraciones (0, 50, 100, 200 IU/ml) (eje x).

Con esta curva estándar se pueden ver los resultados por el promedio de las extinciones de las pruebas. Para el cálculo de la curva estándar se debe utilizar la función matemática punto a punto.

8.3 Curva típica de estándar



8.4 Interpretación de los resultados

Los intervalos de valores normales para el ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio con base en las muestras de la propia población en las áreas geográficas atendidas.

Estos son los datos normativos:

Positivo	>55 IU/ml	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno.
Zona intermedia	50 – 55 IU/ml	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas.
Negativo	<50 IU/ml	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno es poco probable.

9. PERFORMANCES DU TEST

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas. Los datos de rendimiento se han determinado con muestras de suero de gatos y perros.

9.1 Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,575	2,23
#2	24	1,218	2,18
#3	24	1,056	3,23
Inter ensayo	n	Promedio (IU/ml)	CV (%)
#1	12	43,61	9,97
#2	12	8,54	11,47
#3	12	118,07	5,54

9.2 Especificad Relativa

La especificidad relativa del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico (relativo a los resultados de otras pruebas serológicas)..

Especificad relativa gatos:	> 98 %	(95 % Intervalo de confianza: 80,49 % - 100 %)
Especificad relativa perros:	91,18 %	(95 % Intervalo de confianza: 76,32 % - 100 %)

9.3 Sensibilidad Relativa

La sensibilidad relativa del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico (relativo a los resultados de otras pruebas serológicas)..

Sensibilidad de relativa gatos:	> 98 %	(95 % Intervalo de confianza: 87,23 % - 100 %)
Sensibilidad de relativa perros:	90,32 %	(95 % Intervalo de confianza: 74,25 % - 100 %)

9.4 Interferencias

Las muestras lipémicas, ictéricas 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.

9.5 Reacción cruzada

Las reacciones cruzadas no pueden ser excluidas.

10. 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.

11. 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.
- Sólo para uso de investigación.
- Todos los materiales de origen humana 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 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 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 está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

11.1 Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1)
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.

Los reactivos pueden contener 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (consulte el cap. 3.1)
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H315	Provoca irritación cutánea.
H319	Provoca irritación ocular grave.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P337+P313	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.







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

11.2 Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	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.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta y advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta