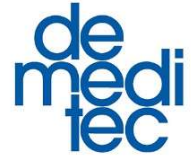


Product information

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



Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA



DECORG0090



96



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

CONTENTS / CONTENIDO

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.....	6
10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	7
11. PRECAUTIONS AND WARNINGS	7
1. USO PREVISTO.....	9
2. PRINCIPIO DEL ENSAYO	9
3. MATERIALES	9
4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE.....	10
5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	10
6. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	10
7. PROCEDIMIENTO	11
8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	11
9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	12
10. LIMITACIONES DEL ENSAYO	13
11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	13
ABBREVIATIONS.....	15
SUMMARY OF TEST PROCEDURE.....	15
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against Corynebacterium diphtheriae toxin in human serum or plasma (citrate, heparin).

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

- SORB** **MT** **Microtiterplate**: 12 break apart 8-well snap-off strips coated with Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) antigens; in resealable aluminium foil.
- SAM** **DIL** **IgG 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** **SOLN** **Stop Solution**: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- 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.
- ENZ** **CONJ** **Conjugate**: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- SUB** **TMB** **TMB Substrate Solution**: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0,1 %; ready to use; yellow cap.
- CAL** **A - D** **Standards**: 4 vials, each containing 2 mL standard; coloured yellow; ready to use; ≤ 0.02% (v/v) MIT.

Standard A:	0.000	IU/mL; blue cap
Standard B:	0.015	IU/mL; green cap
Standard C:	0.075	IU/mL; yellow cap
Standard D:	0.150	IU/mL; red cap

The standards are calibrated in accordance with the "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG (WHO, 2012).

*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 Microtiterplates
- 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 Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) 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. WASH SOLN 20x

Dilute WASH SOLN 20x 1 + 19; e. g. 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL distilled water. The diluted buffer (WASH SOLN 1x) 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. SUB TMB

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. SUB TMB should be colourless or could have a slight blue tinge. If SUB TMB turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6. 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...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 SAM DIL. Dispense 10 µL sample and 1 mL SAM DIL 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 up to five and the volume of **WASH SOLN 1x** 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 **WASH SOLN 1x**. 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 **SUB TMB** 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 SOLN** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB TMB**, 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 SOLN**.

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 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
- **Standard A:** Absorbance value < 0.200
- **Standard B:** Absorbance value > 0.100
- **Standard C:** Absorbance value > 0.500
- **Standard D:** Absorbance value > 1.000

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

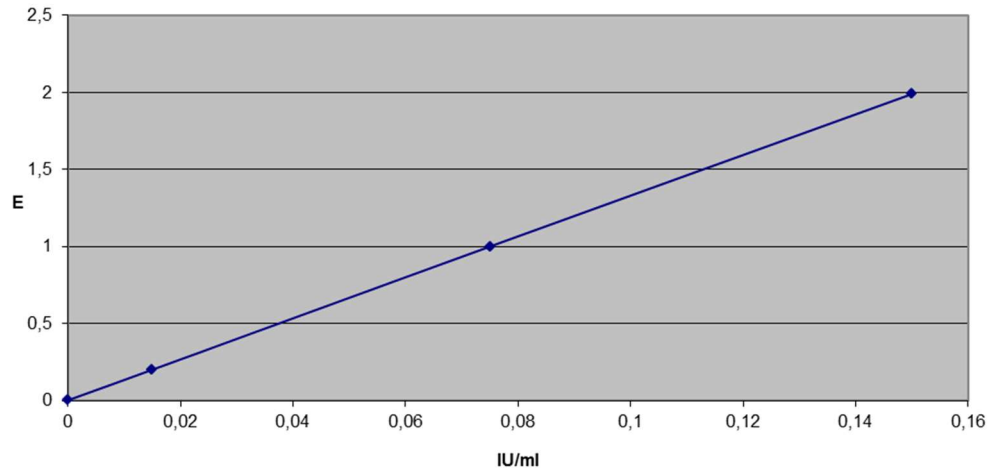
If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

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 (0.000, 0.015, 0.075, 0.150 IU/mL) and draw a standard calibration 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 patient sample. 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

according to: RKI 1999

< 0.01 IU/mL	No protective antibody level! Immediate full course of basic immunization is recommended!
0.01 - 0.09 IU/mL	No reliable protection! Immediate booster injection is recommended.
0.1 – 1.0 IU/mL	Reliable protection!
> 1.0 IU/mL	Reliable long term protection: After about 10 years after last booster control and booster injection is recommended. It is recommended that the basic immunisation or booster is checked 4-6 weeks after immunisation and to record the data on the certificate of vaccination.

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.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1. Precision

Intraassay	n	Mean value (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02

Interassay	n	Mean value (IU/mL)	CV (%)
#1	12	0.00783	12,95
#2	12	0.03447	6,99
#3	12	0.03539	6,86

9.2. 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 100% (95% confidence interval: 89.42% - 100%).

9.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 100% (95% confidence interval: 95.44% - 100%).

9.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity (according to CLSI EP17-A) is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator. It is 0.00092 IU/mL.

9.5. 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.

9.6. Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

9.7. Measurement range

The measurement range is 0.00092 IU/mL – 0.15 IU/mL.

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 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.

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.

1. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzimática Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra Corynebacterium diphtheriae toxin en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

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 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.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- SORB** **MT** **Placa de Microtitulaciones:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Corynebacterium diphtheriae toxin (toxóide), en bolsa de aluminio.
- SAM** **DIL** **Tampón de Dilución de Muestras IgG:** 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).
- STOP** **SOLN** **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- 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.
- ENZ** **CONJ** **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
- 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.
- CAL** **A - D** **Estándar:** 4 botellas, conteniendo cada una 2 mL de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
 Estándar A: 0,000 IU/mL; tapa azul
 Estándar B: 0,015 IU/mL; tapa verde
 Estándar C: 0,075 IU/mL; tapa amarilla
 Estándar D: 0,150 IU/mL; tapa roja
 Los estándares se calibran de acuerdo con la norma de la OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012).

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 Placas 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 a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno de Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid). 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. WASH SOLN 20x

Diluir WASH SOLN 20x 1+19; por ejemplo. 10 mL WASH SOLN 20x + 190 mL de agua destilada. El Tampó diluido (WASH SOLN 1x) es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...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.

5.3. SUB TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. SUB TMB debeseer incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si SUB TMB se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

6. 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...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas 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 SAM DIL, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL SAM DIL, 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 lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de **WASH SOLN 1x** 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 (se recomienda determinar en duplicado). 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 $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

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 **WASH SOLN 1x**. 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. antes del siguiente paso.
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 número 4.
8. Pipetar 100 µL de **SUB 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 **STOP SOLN** en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el **SUB 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 **STOP SOLN**.

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. CÁLCULO 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 $> 0,100$
- **Estándar C:** valor de la extinción $> 0,500$
- **Estándar D:** valor de la extinción $> 1,000$

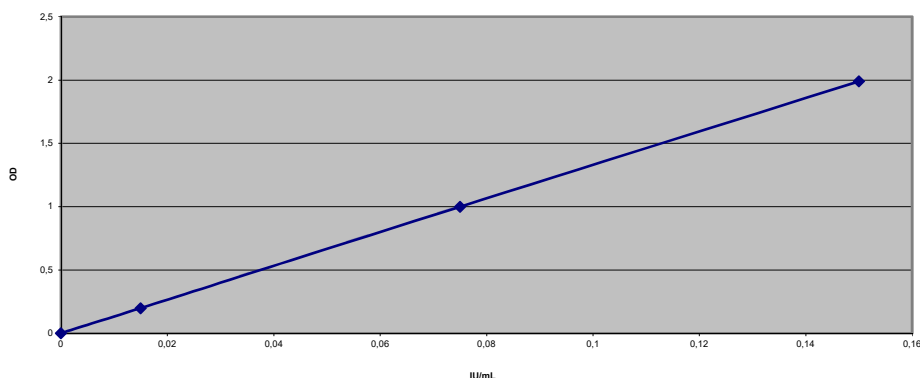
Estándar A < Estándar B < Estándar C < Estándar D

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

8.2. Cálculo de los resultados

Para obtener resultados cuantitativos en IU/mL, representar la (media) de la extinción de los estándares A, B, C, y D en papel gráfico (lineal/lineal) en el eje vertical (Y) y sus concentraciones 0,000; 0,015; 0,075; 0,150 IU/mL en el eje horizontal (X). Trazar la curva correspondiente. Leer los resultados a partir de esta curva utilizando para ello los valores de la (media) extinción de pacientes. 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

de acuerdo con: RKI 1999

< 0,01 IU/mL	No existe nivel protector de anticuerpos! Se recomienda una inmunización básica urgentemente!
0,01 – 0,09 IU/mL	Protección no efectiva! Administrar inmediatamente una inyección de recuerdo.
0,1 – 1,0 IU/mL	Protección efectiva!
> 1,0 IU/mL	Protección efectiva a largo plazo. Después de 10 años de se recomienda un control y una dosis de recuerdo. Se recomienda controlar el nivel de anticuerpos 4-6 semanas después de una inmunización básica o una dosis de recuerdo y registrar dicho dato en el carnet vacunal.

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.

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

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

9.1. Precisión

Intra ensayo	n	Mé dia (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02

Inter ensayo	n	Mé dia (IU/mL)	CV (%)
#1	12	0,00783	12,95
#2	12	0,03447	6,99
#3	12	0,03539	6,86

9.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 89,42% - 100%).

9.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 95,44% - 100%).

9.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (según CLSI EP17-A) se define como la menor concentración que se puede distinguir del estándar cero. Es de 0,00092 IU/mL.

9.5. 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.

9.6. Reactividad cruzada

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad no dieron falsos positivos debidos a reactividad cruzada.

9.7. Intervalo de medición

El intervalo de medición es 0,00092 IU/mL – 0,15 IU/mL.

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.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales di origen humana o animal deveram 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 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.

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.

ABBREVIATIONS

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

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

Corynebacterium diphtheriae toxin IgG












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 (1+100 diluted)
Standard A	-	100 µL	-	-	-	-
Standard B	-	-	100 µL	-	-	-
Standard C	-	-	-	100 µL	-	-
Standard D	-	-	-	-	100 µL	-
Sample (1+100 diluted)	-	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH SOLN 1x						
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH SOLN 1x						
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark						
STOP SOLN	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)						

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 advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<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