



Instructions for Use

Entamoeba histolytica IgG ELISA

IVD



REF EIA-3474

 96



DRG 

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

Distributed by:

DRG 

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

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

Table of Contents / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	2
2	SUMMARY.....	2
3	PRINCIPLE OF PROCEDURE.....	2
4	REAGENTS.....	2
5	STATEMENT OF WARNINGS.....	3
6	STORAGE.....	3
7	PREPARATION.....	3
8	SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.....	3
9	ASSAY PROCEDURE.....	3
10	READING OF RESULTS.....	4
11	QUALITY CONTROL.....	4
12	TROUBLESHOOTING.....	4
13	INTERPRETATION OF RESULTS.....	5
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	5
15	REFERENCES / LITERATURE.....	5
1	REAGENTI.....	6
2	PRECAUZIONI.....	6
3	CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE.....	6
4	PREPARAZIONE.....	6
5	RACCOLTA DEI CAMPIONI.....	7
6	PROCEDURA DEL TEST.....	7
7	LA LETTURA DI RISULTATI.....	8
8	CONTROLLO DI QUALITÀ.....	8
9	RISOLUZIONE DEI PROBLEMI.....	8
10	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	8
11	CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO.....	8
1	REACTIVOS.....	9
2	PRECAUCIONES.....	9
3	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.....	9
4	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	9
5	TOMA DE MUESTRAS.....	10
6	PROCEDIMIENTO.....	10
7	LA LECTURA DE RESULTADOS.....	11
8	CONTROL DE CALIDAD.....	11
9	RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	11
10	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	11
11	CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO.....	11
	SYMBOLS USED.....	12

1 INTENDED USE

The *E. histolytica* ELISA test is a qualitative enzyme immunoassay for the detection of antibodies to *E. histolytica*, in samples of human serum or plasma. This test is intended to be performed by trained medical technologists only.

2 SUMMARY

Amebiasis is the disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. This organism is endemic throughout the world in developing countries, and can be found in immigrants and travelers from these areas. The disease usually manifests with intestinal symptoms. In a minority of cases, the organism will become extra-intestinal and lead to abscess formation in different organs. Of the organs that could be affected, the liver is the most common site. Typically, the organism can no longer be found in the feces once the disease goes extra-intestinal. Serological tests are useful in detecting infection by *E. histolytica* if the organism goes extra-intestinal and in excluding the organism from the diagnosis of other disorders (e.g. chronic liver diseases, ulcerative colitis, etc.). This serology test should not be used for detecting intestinal infections. An Ova & Parasite (O&P) test or an *E. histolytica* fecal antigen assay is the proper assay for intestinal infections.

Since antibodies may persist for years after clinical cure, a positive serological result may not necessarily indicate an active infection. A negative serological result however can be equally important in excluding suspected tissue invasion by *E. histolytica*.

3 PRINCIPLE OF PROCEDURE

The microwells are coated with *E. histolytica* antigen. During the first incubation with the diluted patients' sera, any antibodies which are reactive with the antigen will bind to the coated wells. After washing to remove the rest of the sample, the Enzyme Conjugate is added. If antibodies have been bound to the wells, the Enzyme Conjugate will then bind to these antibodies. After another series of washes, a chromogen (tetramethylbenzidine or TMB) is added. If the Enzyme Conjugate is present, the peroxidase will catalyze a reaction that consumes the peroxide and turns the chromogen from clear to blue. Addition of the Stop Solution ends the reaction and turns the blue color to a bright yellow color. The reaction may then be read visually or with an ELISA reader.

4 REAGENTS

Item	Description	Symbol
Microtiterwells	Microwells containing <i>E. histolytica</i> antigens - 96 test wells in a test strip holder	MT PLATE
Enzyme Conjugate	One (1) bottle containing 11 mL of Protein-A conjugated to peroxidase	CONJ
Positive Control	One (1) vial containing 1 mL of diluted positive rabbit serum	CONTROL +
Negative Control	One (1) vial containing 1 mL of diluted negative human sera	CONTROL -
Chromogen TMB	One (1) bottle containing 11 mL of the chromogen tetramethylbenzidine (TMB)	SUBS TMB
Wash Concentrate (20X)	One (1) bottle containing 25 mL of concentrated buffer and surfactant	WASH BUF
Dilution Buffer	Two (2) bottles containing 30 mL of buffered protein solution	SPECM DIL
Stop Solution	One (1) bottle containing 11 mL of 1 M phosphoric acid	SOLN

5 STATEMENT OF WARNINGS

- **Do not deviate from the specified procedures when performing this assay.** All specimen dilutions, incubation times/temperatures and washings have been optimized for the best performance characteristics. Deviations from the specified procedures may affect the sensitivity and specificity of the assay.
- For in Vitro Diagnostic Use Only
- Do not interchange reagents between kits with different lot numbers.
- Do not use reagents that are beyond their expiration dates. Expiration dates are on each reagent label. Use of reagents beyond their expiration dates may affect results.
- Unused microwells should be stored in the desiccated pouch to protect them from moisture.
- Do not use solutions if they precipitate or become cloudy.
Exception: Wash concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will dissolve upon warming.
- Do not add azides to the samples or any of the reagents.
- Controls and some reagents contain Thimerosal as a preservative, which may be irritating to skin, eyes and mucous membranes. In case of contact, flush eyes or rinse skin with copious amounts of water.
- Do not use serum that may have supported microbial growth, or is cloudy due to high lipid content. Samples high in lipids should be clarified before use.
- Treat all reagents and samples as potentially infectious materials. Positive control has been tested and found negative for Hepatitis B surface antigen and for the antibody to HIV by required test methods. Use care to prevent aerosols and decontaminate any spills of samples.
- Stop Solution is a 5% solution of phosphoric acid in water. If spilled on the skin, wash with copious amounts of water. If acid gets into the eyes, wash with copious amounts of water and seek medical attention.

6 STORAGE

- Reagents, strips and bottled components should be stored at 2 °C - 8 °C.
- Squeeze bottle containing diluted wash buffer may be stored at room temperature (15 °C - 25 °C).

7 PREPARATION

- Before use, bring all reagents and samples to room temperature (15 °C - 25 °C) and mix.
- (20X) Wash Concentrate may precipitate during refrigerated storage, but will go back into solution when brought to room temperature and mixed. **Ensure that (20X) Wash Concentrate is completely in solution before diluting to working concentration.** To dilute (20X) Wash Concentrate to working dilution, remove cap and add contents of one bottle of Wash Concentrate to a squeeze bottle containing 475 mL of DI water. Swirl to mix. Squeeze bottle should have a narrow tip to optimize washings.

8 SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Serum or plasma (collected with heparin, EDTA, or citrate) should be stored at 2 °C - 8 °C if it is to be analyzed within 5 days.

Samples may be held for extended storage at -20 °C or lower for 1 year.

Freezing whole blood samples is not advised.

Do not heat inactivate samples and avoid repeated freezing and thawing of samples.

9 ASSAY PROCEDURE

9.1 Materials Provided

E. histolytica IgG ELISA Kit

9.2 Materials Required But Not Provided

- Micropipettes
- Squeeze bottle for washing strips (narrow tip is recommended)
- Reagent grade (DI) water
- Graduated cylinder
- Sample dilution tubes
- Absorbent paper
- Timer

9.3 Suggested Materials

ELISA plate reader with a 450 nm and a 650 to 620 nm filter (optional if results are read visually)

9.4 Proper Temperature

All incubations are at room temperature (15 °C - 25 °C).

9.5 Test Procedure

Notes:

- Ensure all samples and reagents are at room temperature (15 °C - 25 °C).
 - When running the assay, try to avoid the formation of bubbles in the wells. Bubbles may affect overall performance and reading of end results. Slapping the wells out on a clean absorbent towel after each step should help to minimize bubbles in the wells.
 - Negative and positive controls are supplied pre-diluted. DO NOT dilute further.
1. Break off number of wells needed (two for controls plus number of samples) and place in strip holder.
 2. Dilute patient sera 1:64 in Dilution Buffer (e.g. 5 µL sera and 315 µL dilution buffer).
 3. Add **100 µL** of the negative control to well #1,
100 µL of the positive control to well #2 and
100 µL of the diluted test samples to the remaining wells.
 4. Incubate at room temperature for **10 minutes**, then wash*.
After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.
 5. Add **2 drops (100 µL)** of Enzyme Conjugate to each well.
 6. Incubate at room temperature for **5 minutes**, then wash*.
After last wash step, slap the wells on a clean absorbent towel to remove excess wash buffer.
 7. Add **2 drops (100 µL)** of the Chromogen to each well.
 8. Incubate at room temperature for **5 minutes**.
 9. Add **2 drops (100 µL)** of the Stop Solution to each well. Mix wells by gently tapping the side of the strip holder with index finger for approximately **15 seconds**.
 10. Read within 1 hour of adding Stop Solution.

* Washings consist of vigorously filling each well to overflowing and decanting contents three (3) separate times.
If using automated washers: add 1 minute dwell time between washings and increase number of washes from three to five.

When possible, avoid formation of bubbles in the wells as this may affect the end results.

10 READING OF RESULTS

Visually: Look at each well against a white background (e.g. paper towel) and record as clear or +, ++ or +++ reaction.

ELISA Reader: Zero reader on air. Set for bichromatic readings at 450/620-650 nm.

11 QUALITY CONTROL

The use of controls allows validation of kit stability. The kit should not be used if any of the controls are out of range.

Expected values for the controls are:

Negative 0.0 to 0.20 OD units

Positive 0.50 OD units and above

12 TROUBLESHOOTING

Negative control has excessive color after development.

Reason: Inadequate washings.

Correction: Wash more vigorously. Remove excessive liquid from the wells by tapping against an absorbent towel. Do not allow test wells to dry out.

13 INTERPRETATION OF RESULTS

13.1 Interpretation of Results - ELISA Reader

Zero ELISA Reader on air. Read all wells at 450/620-650 nm.

Positive - Absorbance reading equal to or greater than 0.3 OD units.

Negative - Absorbance reading less than 0.3 OD units.

13.2 Interpretation of Results - Visual

Compare results to the controls.

A sample should be interpreted as positive if the degree of color development is significant and obvious.

13.3 Limitations of the Procedure

Diagnosis of *E. histolytica* infection should not be made solely based on results of the ELISA *E. histolytica* test alone, but in conjunction with other clinical signs and symptoms and other laboratory findings. Epidemiologic factors, clinical findings, exposure to endemic regions, and other laboratory results should be considered when making a diagnosis.

13.4 Expected Values

The number of antibody positive subjects in a population depends on two factors: disease prevalence and clinical criteria used to select the tested population. Because very few positives should be seen in a randomly screened population in a non-endemic area, most serology tests are not specific enough to screen non-endemic populations. Even in an endemic region, serology screening often yields many false positives if used to randomly screen patients. Serology tests are useful to test patients in an endemic region with signs and symptoms consistent with the disease.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

		Reference Method*	
		+	-
EIA-3474	+	14	0
	-	0	65

Positive Agreement: 100% (14/14)

Negative Agreement: 100% (65/65)

*Reference Method refers to a commercially available ELISA.

15 REFERENCES / LITERATURE

1. Patterson, M. et. al. Serologic Testing for Amebiasis. *Gastroenterology*. 78:136, 1980
2. Healy, G. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Bull NY Acad Med*. 47:478, 1971
3. Healy, G. Immunologic Tools in the Diagnosis of Amebiasis: Epidemiology in the United States. *Rev Infect Diseases*. Vol.8,#2:239, 1986
4. Walsh, J. Problems in Recognition and Diagnosis of Amebiasis: Estimation of the Global Magnitude of Morbidity and Mortality. *Rev Infect Diseases*. Vol.8,#2:228, 1986

Per uso diagnostico in vitro.

1 REAGENTI

Item	Description	Symbol
Micropiastra	Una micropiastra (12 x 8 pozzetti staccabili) rivestita con dell'antigene E.histolytica	MT PLATE
Coniugato Enzimatico	1 bottiglia, 11 mL, proteina A coniugate con perossidasi	CONJ
Controllo Positivo	1 flacone, 1 mL, siero diluito positivo	CONTROL +
Controllo Negativo	1 flacone, 1 mL, siero diluito, negativo	CONTROL -
Cromogeno	1 bottiglia, 11 mL, cromogeno di tetrametilbenzidina (TMB)	SUBS TMB
Concentrato di Lavaggio (20X)	1 bottiglia, 25 mL, tampone concentrati ed il surfactant	WASH BUF
Tampone di Diluizione	2 bottiglie, 30 mL, Soluzione proteica tamponata	SPECM DIL
Soluzione di Arresto	1 bottiglia, 11 mL, 1 M acido fosforico	SOLN

2 PRECAUZIONI

- Nell'eseguire l'analisi non deviare dalle procedure specificate. Tutte le diluizioni dei campioni, i tempi e le temperature di incubazione e i lavaggi sono stati ottimizzati per le migliori caratteristiche di rendimento. Eventuali deviazioni dalle procedure specificate potrebbero influire sulla sensibilità e sulla specificità dell'analisi.
- Esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Non usare reagenti scaduti. La data di scadenza è riportata sull'etichetta di ciascun reagente. L'uso di reagenti scaduti potrebbe influire sui risultati.
- I micropozzetti inutilizzati vanno riposti nella busta contenente essiccante per proteggerli dall'umidità.
- Non usare soluzioni precipitate o che appaiono torbide. Il concentrato di lavaggio potrebbe esibire cristallizzazione se conservato a 2 °C - 8 °C. La cristallizzazione scompare dopo la diluizione alla concentrazione di lavoro.
- Non aggiungere azidi ai campioni o ad alcuno dei reagenti.
- I controlli ed alcuni reagenti contengono Thimerosal come conservante, Quale potrebbe irritare per sbucciare, gli occhi e le mucose. In caso di contatto, in caso di occhi di flusso o la risciacquata sbucciano con gli ammontare abbondanti di acqua.
- Non usare siero suscettibile di avere flora microbica o con un aspetto torbido a causa dell'alto contenuto di lipidi. I campioni con contenuto elevato di lipidi vanno chiarificati prima dell'uso.
- Trattare tutti i sieri come se fossero infetti. I controlli sono stati analizzati con le metodiche di analisi previste e sono risultati negativi per l'antigene di superficie dell'epatite B e gli anticorpi dell'HIV. Il presente prodotto va usato nelle condizioni di sicurezza considerate idonee per qualsiasi agente potenzialmente infetto.
- La soluzione di arresto è una soluzione al 5% di acido fosforico in acqua. In caso di versamento sulla cute, lavare con copiose quantità di acqua. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, lavare con copiose quantità di acqua e richiedere assistenza medica.

3 CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

Reagenti, strisce reattive e componenti contenuti in flaconi: conservare alla temperatura di 2 °C - 8 °C.

La bottiglia comprimibile contenente tampone di lavaggio diluito può essere conservata a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C).

4 PREPARAZIONE

Prima dell'uso, portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) e miscelare.

Il concentrato di lavaggio (20X)

potrebbe precipitare durante la conservazione in frigorifero, ma tornerà in soluzione quando riportato alla temperatura ambiente e miscelato. **Accertarsi che il concentrato di lavaggio (20X) sia completamente in soluzione prima di diluirlo alla concentrazione di lavoro.**

Per diluire il concentrato di lavaggio (20X) alla diluizione di lavoro, togliere il tappo e versare il contenuto di un flacone di concentrato di lavaggio in una bottiglia comprimibile contenente 475 mL di acqua deionizzata. Miscelare agitando con movimenti circolari. La bottiglia comprimibile deve avere una punta stretta per ottimizzare i lavaggi.

5 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 5 giorni a 2 °C - 8 °C.

Campioni magazzinetti per un periodo più lungo (12 mesi) dovrebbero essere congelati a ≤ 20 °C.

Non inattivare sieri con calore e evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

6 PROCEDURA DEL TEST

6.1 Materiali richiesti ma non in dotazione

- Pipette
- Bottiglia comprimibile con punta stretta
- Acqua distillata o deionizzata in vetro
- Provette per le diluizioni
- Un panno assorbente
- Lettore per strisce di micropozzetti in grado di leggere a lunghezze d'onda di 450 & 620-650 nm
- Timer

6.2 Procedura

Accertarsi che tutti i campioni e i reagenti siano a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C).

Quando si esegue l'analisi, cercare di evitare la formazione di bolle nei pozzetti. Le bolle possono influire sulle prestazioni generali e sui risultati dell'analisi. Per ridurre al minimo la possibilità che si formino bolle nei pozzetti, si consiglia di batterli su un panno assorbente pulito.

I controlli negativo e positivo sono forniti prediluiti. NON diluirli ulteriormente.

1. Separare il numero di pozzetti necessario (due per i controlli oltre al numero di campioni) e posarli nell'apposito supporto.
2. Fare una diluizione **1:64** dei sieri dei pazienti usando il tampone di diluizione (p.es. 5 μ L siero e 315 μ L tampone di diluizione).
3. Dispensare **100 μ L** di controllo negativo nel pozzetto n. 1,
100 μ L di controllo positivo nel pozzetto n. 2 e
100 μ L dei campioni di analisi diluiti (1:64) nei pozzetti rimanenti.
4. Incubare a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) per **10 minuti**.
Eliminare il contenuto e lavare per 3 volte con tampone di lavaggio diluito.* Dopo l'ultima fase di lavaggio, battere i pozzetti su un panno assorbente pulito per asportare il tampone di lavaggio in eccesso.
5. Aggiungere **2 gocce (100 μ L)** di coniugato enzimatico in ciascun pozzetto.
6. Incubare a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) per **5 minuti**.
Eliminare il contenuto e lavare per 3 volte con tampone di lavaggio diluito.* Dopo l'ultima fase di lavaggio, battere i pozzetti su un panno assorbente pulito per asportare il tampone di lavaggio in eccesso.
7. Aggiungere **2 gocce (100 μ L)** di cromogeno in ciascun pozzetto.
8. Incubare a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) per **5 minuti**.
9. Aggiungere **2 gocce (100 μ L)** di soluzione di arresto in ciascun pozzetto. Miscelare i pozzetti battendo leggermente il lato del supporto con il dito indice per circa **15 secondi**.
10. Leggere i pozzetti.

* Nota: i lavaggi consistono nel riempire fino in alto i pozzetti, gettare via il contenuto e riempire di nuovo.

Se si utilizzana un lavatore automatico: aggiungere 1 minuto di tempo di pausa tra i lavaggi e aumentare il numero di lavaggi da tre a cinque.

Durante le fasi di lavaggio evitare di creare bolle nei pozzetti.

7 LA LETTURA DI RISULTATI

Visivamente: Osservare ciascun pozzetto contro uno sfondo bianco e registrare un risultato trasparente o una reazione +, ++ o +++.

Lettore ELISA: Azzerare il lettore ELISA rispetto all'aria o vuoto bene, usando il tampone di diluizione come campione, leggere i pozzetti a 450/620-650 nm

8 CONTROLLO DI QUALITÀ

L'uso dei controlli consente la convalida della stabilità del kit. Il kit non va usato se uno o più controlli non rientrano nei limiti.

I valori previsti per i controlli sono:

Negativo: 0.0 to 0.20 unità OD

Positivo: 0.50 unità OD e superiori

9 RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

il controllo negativo presenta una colorazione eccessiva dopo lo sviluppo.

Motivo: lavaggi inadeguati.

Correzione: lavare più vigorosamente. Eliminare dai pozzetti il liquido in eccesso battendo contro un panno assorbente. Non lasciare seccare i pozzetti di analisi.

10 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

10.1 Interpretazione dei risultati - Lettore ELISA

Leggere i pozzetti a 450/620-650 nm

Positivo – Valore di assorbanza maggiore di o uguaglia a 0.3 unità OD

Negativo – Valore di assorbanza minore di 0.3 unità OD

10.2 Interpretazione dei risultati - Visivamente

Confrontare i risultati dei pazienti ai controlli.

Un campione va interpretato come positivo se il grado di sviluppo cromatico è significativo e ovvio.

10.3 Limitazioni delle procedure

I risultati sierologici costituiscono un ausilio alla diagnosi, ma non possono essere usati come unico metodo di diagnosi.

10.4 Valori attesi

Il numero d'individui che evidenzia risultati positivi può variare notevolmente tra popolazioni e regioni geografiche. Se possibile, ciascun laboratorio deve stabilire un intervallo previsto per la propria popolazione di pazienti.

11 CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

		Metodo di riferimento*	
		+	-
EIA-3474	+	14	0
	-	0	65

Accordanza positive: 100% (14/14)

Accordanza negativa: 100% (65/65)

* Metodo di riferimento fa riferimento a un ELISA commercialmente disponibile.

Para uso *diagnóstico in vitro*.

1 REACTIVOS

Item	Description	Symbol
Microplaca	Una microplaca (12 x 8 pocillos separables) revestida con de antígeno E. histolytica	MT PLATE
Conjugado Enzimático	1 Recipiente 11 mL la protein A conjugada con peroxidasa	CONJ
Control Positivo	1 vial 1 mL suero positivo diluido	CONTROL +
Control Negativo	1 vial 1 mL suero negativo y diluido	CONTROL -
Chromogen	1 Recipiente 11 mL chromogen tetrametilbenzidina (TMB)	SUBS TMB
El Concentrado Para Lavado (20X)	1 Recipiente 25 mL búfer y surfactant concentrados	WASH BUF
De Solución Amortiguadora Para Dilución	2 Recipientes 30 mL de solución amortiguadora de proteína	SPECM DIL
Solución Quelante	1 Recipiente 11 mL, 1 M ácido fosfórico	SOLN

2 PRECAUCIONES

- **No desviarse de los procedimientos especificados al realizar este ensayo.** Todas las diluciones de las muestras, los tiempos y las temperaturas de incubación y los lavados se han optimizado para tener las mejores características de rendimiento. Las desviaciones de los procedimientos especificados pueden afectar la sensibilidad y la especificidad de este ensayo.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro.
- No utilizar reactivos que han pasado la fecha de caducidad. Las fechas de caducidad se encuentran en la etiqueta de cada reactivo. El uso de reactivos después de su fecha de caducidad puede afectar los resultados.
- Los micropocillos sin usar se deben almacenar en la bolsa desecante para protegerlos de la humedad.
- No utilizar soluciones que precipitan o se ponen turbias.
El concentrado para lavado puede mostrar cristalización cuando se almacena a 2 °C - 8 °C. La cristalización desaparecerá después de la dilución hasta la potencia de trabajo.
- No agregar azidas a las muestras ni a ninguno de los reactivos.
- Los controles y algunos reactivos contienen Thimerosal como conservante, cuál puede estar irritando para pelar, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, ojos o aclarado parejos pelan con cantidades copiosas de agua.
- No usar suero que pueda haber tenido crecimiento microbiano o que se encuentre turbio debido a un alto contenido lipídico. Las muestras con altos contenidos de lípidos se deben clarificar antes de usar.
- Tratar todo el suero como si pudiera ser infeccioso. Los controles se han analizado por medio de los métodos de prueba requeridos y se ha encontrado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anticuerpo contra el VIH. Este producto se debe usar bajo las condiciones adecuadas de seguridad que se usarían con cualquier agente potencialmente infeccioso.
- La solución quelante es una solución de ácido fosfórico en agua al 5%. Si salpica la piel, lavar con abundante cantidad de agua. Si el ácido entra en contacto con los ojos, lavar con abundante cantidad de agua y buscar asistencia médica.

3 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos, tiras reactivas y componentes en frascos: Almacenar entre 2 °C - 8 °C.

La botella comprimible que contiene la solución amortiguadora para lavado se puede almacenar a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C).

4 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Antes de usar, llevar todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) y mezclar.

El concentrado para lavado (20X)

puede precipitar durante el almacenamiento refrigerado, pero volverá a su estado de solución cuando regrese a temperatura ambiente y se mezcle. **Asegurarse de que el concentrado para lavado (20X) sea completamente una solución antes de diluir a la concentración de trabajo.**

Para diluir el concentrado para lavado (20X) hasta la dilución de trabajo, retirar la tapa y agregar el contenido de una botella de concentrado para lavado en una botella comprimible que contenga 475 mL de agua desionizada. Girar para mezclar. La botella comprimible debe tener una punta estrecha para optimizar los lavados.

5 TOMA DE MUESTRAS

Las muestras (suero o plasma EDTA, Heparina o citrato) deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 5 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (al menos un año) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo.

No calentar muestras inactivas y evitar la congelación y la descongelación repetidas de las muestras.

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Materiales necesarios pero no suministrados

- Pipetas
- Botella comprimible con una abertura de punta estrecha.
- Agua destilada o desionizada.
- Tubos para dilución de muestras
- Toalla absorbente limpia
- Lector ELISA con a 450 nm con un filtro de referencia a 620-650 nm
- Temporizador

6.2 Procedimiento de la prueba

Asegurarse de que todas las muestras y los reactivos estén a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C)

Cuando se realice el ensayo, evitar la formación de burbujas en los pocillos. Las burbujas pueden afectar al rendimiento general y a la lectura de los resultados finales. Golpear los pocillos sobre una toalla absorbente limpia después de cada paso puede ayudar a minimizar las burbujas.

Los controles negativos y positivos se suministran prediluidos. NO diluir más.

1. Cortar la cantidad de pocillos necesarios (dos para los controles más el número de muestras) y colocarlos en el soporte.
2. Preparar una dilución **1:64** de suero de los pacientes utilizando la solución amortiguadora para dilución (5 µL muestra + 315 µL solución amortiguadora para dilución)
3. Agregar **100 µL** de control negativo al pocillo N° 1, **100 µL** de control positivo al pocillo N° 2 y **100 µL** de las muestras de prueba diluidas (1:64) a los pocillos restantes.
4. Incubar a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) durante **10 minutos**. Agitar el contenido y lavar 3 veces con solución amortiguadora para lavado. *
5. Agregar **2 gotas (100 µL)** de conjugado enzimático en cada pocillo.
6. Incubar a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) durante **5 minutos**. Agitar el contenido y lavar 3 veces con solución amortiguadora para lavado. * Después del último paso de lavado, golpear los pocillos sobre una toalla absorbente limpia para eliminar el exceso de solución amortiguadora para lavado..
7. Agregar **2 gotas (100 µL)** de Chromogen en cada pocillo.
8. Incubar a temperatura ambiente (15 °C - 25 °C) durante **5 minutos**
9. Agregar **2 gotas (100 µL)** de solución quelante en cada pocillo. Mezclar los pocillos golpeando suavemente el lado del soporte con el dedo índice durante aproximadamente **15 segundos**.
10. Leer los pocillos

* Nota: Los lavados consisten en llenar cada pocillo hasta arriba, agitar el contenido y rellenar.

Si se usa lavadores automáticos: añada 1 minuto de tiempo de permanencia entre los lavados y aumente el número de lavados de tres a cinco.

Evitar la generación de burbujas en los pocillos durante las etapas del lavado

7 LA LECTURA DE RESULTADOS

- Visualmente : Observar cada pocillo contra un fondo blanco y registrar como transparente o como reacción +, ++ ó +++.
- Lector ELISA: Poner a cero el lector ELISA con aire en blanco o bien, utilizando el tampón de dilución de la muestra, leer los pocillos a 450/620 - 650 nm.

8 CONTROL DE CALIDAD

El uso de controles permite la validación de la estabilidad del kit. El kit no se debe usar si alguno de los controles se encuentra fuera de rango.

Los valores esperados para los controles son:

- Negativo: 0.0 - 0.20 Unidades OD
Positivo: 0.50 Unidades OD y más

9 RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

El control negativo tiene un exceso de color después del desarrollo

Motivo: lavados insuficientes

Corrección: lavar más vigorosamente. Eliminar el exceso de líquido de los pocillos golpeando contra una toalla absorbente. No dejar que los pocillos de prueba se sequen.

10 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

10.1 Interpretación de los resultados- Lector ELISA

Poner a cero el lector ELISA con aire, leer los pocillos a 450/650 - 620 nm.

Positivo – Lectura de absorbancia mayor que o iguala a 0,3 unidades OD

Negativo – Lectura de absorbancia menor que 0,3 unidades OD

10.2 Interpretación de los resultados - Visualmente

Una muestra se debe interpretar como positiva si el grado de desarrollo del color es obvio y significativo.

10.3 Limitaciones

Serologic results are an aid in diagnosis but cannot be used as the sole method of diagnosis.

Los resultados serológicos se deben usar como ayuda en el diagnóstico y no se deben interpretar como diagnósticos por sí solos.

10.4 Resultados esperados

El número de personas con resultados positivos varía significativamente entre poblaciones y regiones geográficas. De ser posible, cada laboratorio debe establecer un rango esperado para su población de pacientes.

11 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

		Método de referencia *	
		+	-
EIA-3474	+	14	0
	-	0	65

Acuerdo positivo: 100% (14/14)

Acuerdo negativo: 100% (65/65)

*El Método de referencia se refiere a un ELISA disponible comercialmente.

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 conservación	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