

NovaLisa®

Corynebacterium diphtheriae toxin IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	8
Français	14
Italiano	20
Español	26
Português	32
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía/ Bibliografia	38
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	38
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	39
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procédure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	40

Product Number: CORG0090 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Corynebacteria are aerobic non spore-forming gram-positive rods of irregular shape (0.5 –1 µm thick and 2-6 µm long). They comprise skin commensals, opportunist pathogens and several major pathogens, including *Corynebacterium diphtheriae*. In general, they are isolated from throat swabs on selective media containing tellurite. The bacterial infection caused by *C. diphtheriae*, Diphtheria, has two forms. Respiratory diphtheria is typically caused by toxin-producing (toxigenic) strains; cutaneous disease can be caused by either toxigenic or nontoxigenic strains. In the respiratory form of the disease, a membrane is formed; this membrane is usually visible on the throat or tonsils. Persons may die from asphyxiation when the membrane obstructs breathing. Other complications are caused by remote effects of the diphtheria toxin (myocarditis, nerve paralysis). Cutaneous diphtheria is usually mild, typically consisting of non-distinctive sores or shallow ulcers and only rarely involving toxic complications (1-2% of infections with toxigenic strains). Diphtheria was one of the most common causes of death among children during the prevaccine era.

Since the introduction and widespread use of diphtheria toxoid vaccine (formalin-inactivated diphtheria toxin) in most industrialized countries the disease is now characterized by sporadic cases and intermittent outbreaks of low intensity. But recent large epidemics of diphtheria in several eastern European countries have again drawn attention to this „forgotten“ disease – and, the majority of these cases have occurred among adolescents and adults instead of children.

The only effective way to control diphtheria is by prophylactic immunization with diphtheria toxoid. Antibody to the toxoid protects against the action of the toxin; immunized persons can be infected by toxin-producing strains of diphtheria, but the systemic manifestations of diphtheria do not occur. The outcome of the disease improves with early, appropriate treatment. Prompt recognition of the disease is important to assure early, appropriate treatment with diphtheria anti-toxin

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtheria (respiratory)	with malaise, sore throat, anorexia, low-grade fever and swelling of the neck ("bull neck") from inflammation. Complications: exotoxin-induced damage to other organs.	Transmission from person to person through close physical and respiratory contact Transmission is increased in overcrowded and poor socio-economic conditions

The presence of pathogen or infection may be identified by:

- Microscopy
- Serology: e.g. by ELISA

2. 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).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates 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 microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Corynebacterium diphtheriae toxin Coated Microplate (IgG):** 12 break apart 8-well snap-off strips coated with Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent:** 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.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap.
- **Corynebacterium diphtheriae toxin anti-IgG 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.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0,1 %; ready to use; yellow cap; < 5% NMP.
- **Corynebacterium diphtheriae toxin IgG Standards:** 4 vials, each containing 2 ml standard (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use.
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 potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

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

5. 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.

6. 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!

6.1. Coated Microplate

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.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 ml Washing Buffer + 190 ml distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

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

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. For CSF please use the instruction for use ABVL0001. 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.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgG Sample Diluent. Dispense 10 µl sample and 1 ml IgG Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the instruction for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three to five and the volume of Washing Buffer from 300 µl to 350 µl to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

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

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

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µl standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 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.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA microwell plate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA microwell plate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout.

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

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

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, 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.

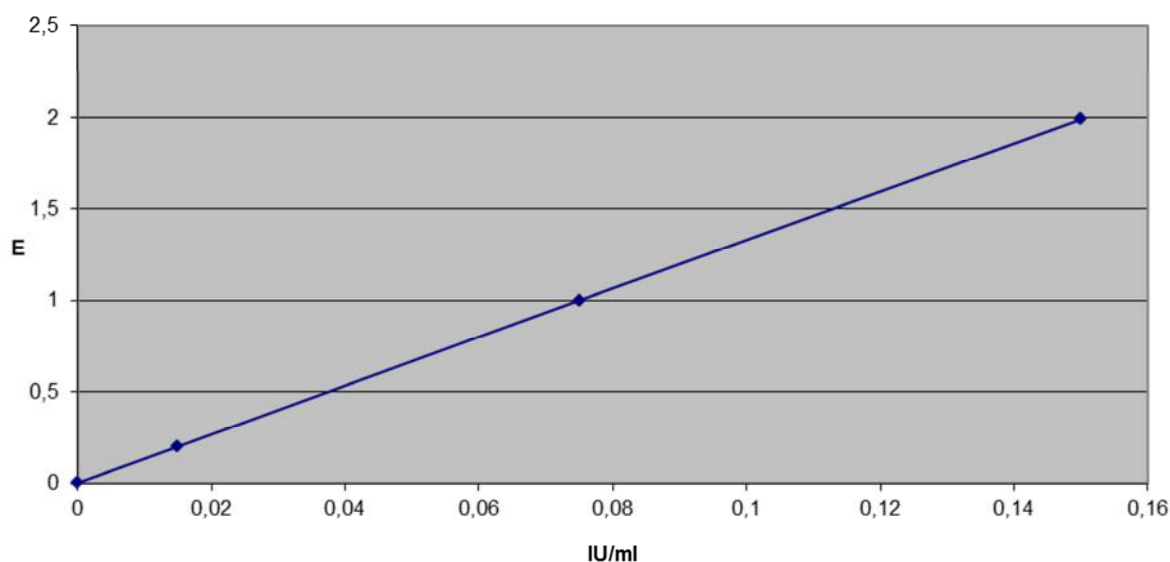
9.2. Calculation of Results

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.

9.3. Typical standard Curve



9.4. 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.

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

For further information about the specific performance characteristics please contact NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. 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	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 100.0% (95% confidence interval: 89.42% - 100.0%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100.0% (95% confidence interval: 95.44% - 100.0%).

10.4. 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.

10.5. 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.

10.6. 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.

10.7. Measurement range

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

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The 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 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 patient 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.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: CORG0090 Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Corynebakterien sind grampositive, nicht sporenbildende, unbewegliche, pleomorphe Stäbchenbakterien, die als besonderes Charakteristikum häufig terminale keulenförmige Auftreibungen zeigen. Sie sind in der Umwelt weit verbreitet. Einige Arten sind tier- und pflanzenpathogen. Neben apathogenen Haut- und Schleimhautbewohnern sind für den Menschen die opportunistisch pathogenen Spezies und der Erreger der Diphtherie (*C. diphtheriae*) von Bedeutung.

Die Pathogenität von *C. diphtheriae* beruht auf der Bildung eines Exotoxins. Die genetische Information zur Bildung dieses Toxins wird durch einen lysogenen Phagen kodiert. Nur Stämme, die diesen oder einen verwandten Prophagen enthalten sind pathogen. Die Erkrankung beginnt nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen als Lokalinfektion. Je nach Eintrittspforten der Erreger entsteht eine Rachen-, Nasen-, Augen-, Wund-, Haut-, Nabel oder Genitaldiphtherie. Das gebildete Toxin führt lokal zu Nekrosen, die einen typischen Foetor ex ore bedingen. Abgestorbene Epithelzellen, Fibrin und Entzündungszellen bilden einen Belag, der Mukosa ziemlich fest anliegt und deshalb als Pseudomembran bezeichnet wird. Im Rachenraum kann diese die Atemwege verlegen und zu schwerer Atemnot führen. Massives Krankheitsgefühl, Fieber und Schwellen der regionalen Lymphknoten kommen hinzu. Bei der Rachendiphtherie kommt es innerhalb von Stunden zum massiven Anschwellen des Halses (Cäsarenhals: Schwellung der regionalen Halslymphknoten und Ausbildung eines periglandulären Ödems). Das Diphtherie Toxin wird auch in die Zirkulation eingeschwemmt und begründet eine systemische Intoxikation, deren schwere vom jeweiligen Organbefall abhängig ist (Herz, Leber, Nieren, Nerven). Diese Spätfolge der Diphtherie kann den Tod bedeuten (toxisches Kreislaufversagen).

Die Keime werden durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. Gesunde Keimträger sind sehr selten. In Mitteleuropa ist die Rachendiphtherie, in den Tropen die Wunddiphtherie die häufigste Form der Krankheit. Es existiert die Möglichkeit einer aktiven Immunisierung mit einem Totimpfstoff.

Der einzige effektive Weg, um Diphtherie zu kontrollieren ist durch prophylaktische Immunisierung mit Diphtherie-Toxoid. Antikörper gegen das Toxoid schützt vor der Wirkung des Toxins; Immunisierte Personen können durch Toxin-produzierende Stämme von Diphtherie infiziert werden, aber die systemischen Manifestationen der Diphtherie treten nicht auf. Das Ergebnis der Krankheit verbessert sich mit einer frühen, angemessenen Behandlung. Früherkennung der Krankheit ist wichtig, um eine frühzeitige, angemessene Behandlung mit Diphtherie-Anti-Toxin zu gewährleisten

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtherie (Respiratorisch)	Mit Malaise, Halsschmerzen, feste Belege im Rachen, Appetitlosigkeit, leichtes Fieber und Schwellung des Halses (Cäsarenhals). Komplikation: Toxin induzierte Organschäden	Tröpfchen- oder Schmierinfektion, von Mensch zu Mensch Die Übertragung wird in überfüllten und schlechten sozioökonomischen Bedingungen erhöht

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie
- Serologie: z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der *Corynebacterium diphtheriae* toxin IgG ELISA ist für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen *Corynebacterium diphtheriae* toxin in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die quantitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Corynebacterium diphtheriae toxin beschichtete Mikrotiterplatte (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer:** 1 Flasche mit 100 ml Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0,2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschpuffer (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe.
- **Corynebacterium diphtheriae toxin anti-IgG Konjugat:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; < 5% NMP.
- **Corynebacterium diphtheriae toxin IgG Standards:** 4 Fläschchen mit 2 ml Standardlösung (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; gebrauchsfertig.
Standard A: 0,000 IU/ml; blaue Verschlusskappe
Standard B: 0,015 IU/ml; grüne Verschlusskappe
Standard C: 0,075 IU/ml; gelbe Verschlusskappe
Standard D: 0,150 IU/ml; rote Verschlusskappe

Die Standards sind am "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012) kalibriert.

Für potenzielle Gefahrstoffe überprüfen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt.

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Plattenlayout

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten (10 - 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

6.1. Beschichtete Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) Antigenen beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

6.2. Waschpuffer (20x konz.)

Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 ml Waschpuffer + 190 ml destilliertes Wasser.

Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

6.3. TMB-Substratlösung

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Für Liquor ist die Arbeitsanleitung ABVL0001 zu verwenden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z. B. 10 µl Probe und 1 ml IgG-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Arbeitsanleitung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschrte von drei auf fünf und das Volumen des Waschpuffers von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Kapitel 12 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µl Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h $\pm$ 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der TMB-Substratlösung pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen.

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

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

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

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

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < 0,100
- **Standard A:** Extinktionswert < 0,200
- **Standard B:** Extinktionswert > 0,100
- **Standard C:** Extinktionswert > 0,500
- **Standard D:** Extinktionswert > 1,000

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

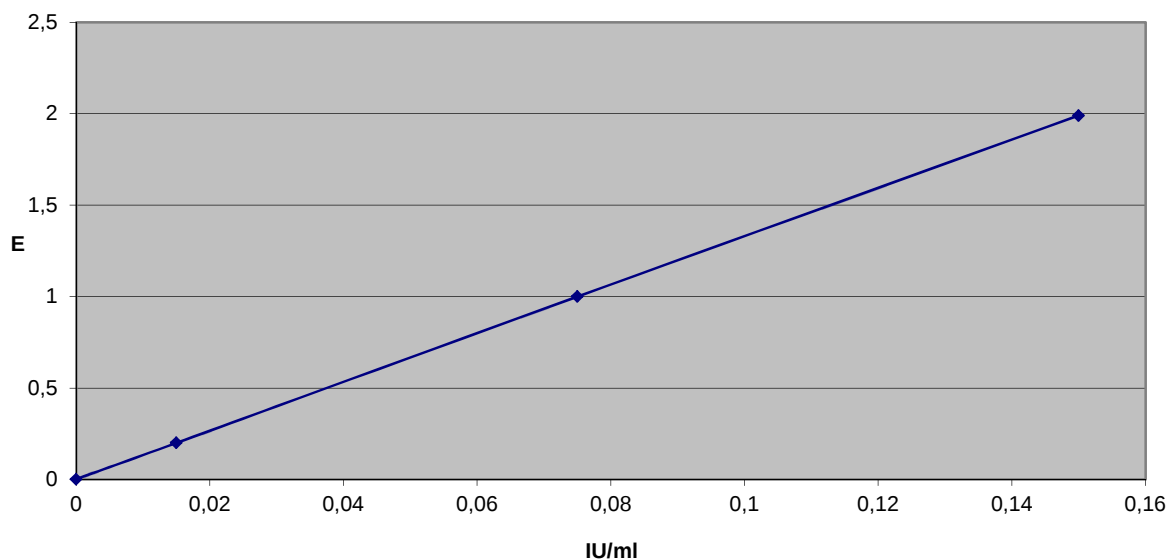
9.2. Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse in IU/ml zu erhalten, werden die Extinktionswerte der vier Standards A, B, C, und D gegen ihre entsprechende Konzentration (0,000; 0,015; 0,075; 0,150 IU/ml) aufgetragen und eine Standardkurve erstellt (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

Anhand dieser Standardkurve lassen sich die Ergebnisse der gemittelten Extinktionswerte der jeweiligen Patientenproben ablesen.

Zur Berechnung der Standardkurve sollte die mathematische „Punkt zu Punkt“ Funktion gewählt werden.

9.3. Typische Standardkurve



9.4. Interpretation der Ergebnisse

In Anlehnung an: RKI 1999

< 0,01 IU/ml	Kein protektiver Antikörperspiegel! Grundimmunisierung empfohlen!
0,01 – 0,09 IU/ml	Kein verlässlicher Schutz vor Infektion! Auffrischimpfung empfohlen
0,1 – 1,0 IU/ml	Verlässlicher Schutz vor Infektion!
> 1,0 IU/ml	Verlässlicher Langzeitschutz! 10 Jahren nach der letzten Impfung wird eine Kontrolle und Auffrischungsimpfung empfohlen. Es wird empfohlen sowohl die Basis- als auch die Auffrischungsimpfung 4 bis 6 Wochen nach der Impfung zu kontrollieren und die Ergebnisse im Impfpass zu vermerken.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden.

Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

10. TESTMERKMALE

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

Für weitere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie bitte NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Interassay	n	Mittelwert (IU/ml)	Vk (%)
#1	12	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100,0% (95% Konfidenzintervall: 89,42% - 100,0%).

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie ist 100,0% (95% Konfidenzintervall: 95,44% - 100,0%).

10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität (gemäß CLSI EP17-A) des Tests ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie ist 0,00092 IU/ml.

10.5. Interferenzen

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

10.6. Kreuzreaktivität

Die Untersuchung eines Probenpanels mit Antikörperaktivitäten gegen potenziell kreuzreagierende Parameter ließ keine Anzeichen von falsch-positiven Ergebnissen aufgrund von Kreuzreaktivitäten erkennen.

10.7. Messbereich

Der Messbereich ist 0,00092 IU/ml – 0,15 IU/ml.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: CORG0090 Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Les corynébactéries sont des bacilles Gram-positifs, aérobies, non sporulés et de forme irrégulière (0.5-1 µm d'épaisseur et 2-6 µm de longueur). Les corynébactéries incluent des bactéries commensales cutanées, des pathogènes opportunistes et plusieurs pathogènes majeurs, y compris *Corynebacterium diphtheriae*. En général, elles sont isolées dans les prélèvements de gorge sur des milieux sélectifs qui contiennent du tellurite. La diphtérie, infection bactérienne provoquée par *Corynebacterium diphtheriae*, a deux formes. La diphtérie respiratoire est typiquement causée par des souches productrices de toxine; la maladie cutanée peut être causée par des souches toxigènes ou non toxigènes. Dans la forme respiratoire de la maladie, une membrane se développe; celle-ci est généralement visible sur la gorge ou les amygdales. La membrane peut être mortelle si elle obstrue la respiration. D'autres complications sont provoquées par des effets à distance de la toxine diphtérique (myocardite, lésions nerveuses -paralysie,). D'habitude, la diphtérie cutanée est bénigne, et comprend des blessures superficielles et des petits ulcères. Des complications toxiques n'apparaissent que rarement (1-2% des infections avec des souches productrices de toxine). La diphtérie était l'une des causes les plus communes de mort parmi les enfants avant l'arrivée des vaccinations. Depuis l'introduction et l'utilisation répandue de l'anatoxine diphtérique (toxine diphtérique inactivée au formol), la maladie est actuellement caractérisée par des cas sporadiques et des manifestations intermittentes faibles, dans la plupart des pays industrialisés. Mais des grandes épidémies récentes de la diphtérie dans plusieurs pays de l'Europe de l'Est ont de nouveau tiré l'attention sur cette maladie "oubliée" – et la majorité de ces cas se sont produits chez des adolescents et des adultes au lieu des enfants.

La seule manière efficace de contrôler la diphtérie est une immunisation prophylactique avec l'anatoxine diphtérique. Des anticorps anti-anatoxine protègent contre la toxine; des personnes immunisées peuvent être infectées par des souches toxigènes de la diphtérie, mais dans ces cas-là, les manifestations systémiques de la diphtérie ne se produisent pas. Les chances de guérison s'améliorent avec un traitement précoce et approprié. Un diagnostic immédiat est important pour assurer un traitement précoce et approprié avec l'antitoxine diphtérique

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex)	Modes de transmission
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphtérie (respiratoire)	Avec malaise, maux de gorge, l'anorexie et une faible fièvre, gonflement du cou par inflammation ("cou de taureau"). <u>Complications:</u> dommages à d'autres organes, provoqués par l'exotoxine	Transmission d'individu à individu par contact étroit (physique ou respiratoire) La transmission augmente dans des conditions socio-économiques défavorables

La présence des bactéries peut être identifiée par:

- Microscopie
- Sérologie: p.ex. ELISA

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse *Corynebacterium diphtheriae* toxin IgG ELISA est prévue pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-*Corynebacterium diphtheriae* toxin dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique quantitative des anticorps spécifiques est basée sur la technique ELISA (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Microplaques sont recouvertes d'antigènes spécifiques pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon détaché, le conjugué peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immun formé par le conjugué lié est visualisé par l'addition tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu.

L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Corynebacterium diphtheriae toxin (IgG) microplaque revêtu:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène de Corynebacterium diphtheriae toxin (anatoxine); en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant pour échantillon IgG:** 1 flacon contenant 100 ml de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH $7,2 \pm 0,2$; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0,2 mol/l; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH $7,2 \pm 0,2$) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué Corynebacterium diphtheriae toxin anti-IgG:** 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps anti-IgG humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort dans le tampon phosphaté (10 mM); prêt à l'emploi; couleur bleue, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune; < 5% NMP.
- **Étalons toxine de Corynebacterium diphtheriae IgG:** 4 flacons contenant chacun 2 ml étalon (sérum humain ou plasma); de couleur jaune; prêt à l'emploi.
Étalon A: 0,000 IU/ml; bouchon bleu
Étalon B: 0,015 IU/ml; bouchon vert
Étalon C: 0,075 IU/ml; bouchon jaune
Étalon D: 0,150 IU/ml; bouchon rouge
Les étalons sont calibrés selon le standard OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012).

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1. Microplaque revêtues

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de Corynebacterium diphtheriae toxin (anatoxine). Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrette restantes doivent être scellés le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

6.2. Tampon de lavage (conc. x 20)

Diluer le Tampon de lavage 1+19; par exemple 10 ml du Tampon de lavage + 190 ml d'eau distillée. L'échantillon de tampon diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3. Solution de substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humain de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Les instructions d'utilisation ABVL0001 doit être utilisé pour le LCS. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec diluant de l'échantillon IgG. Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml l diluant de l'échantillon IgG dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE TEST

8.1. Préparation du test

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un systèmes automatiques pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume du Tampon de lavage de 300 à 350 µl. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi sur la feuille présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1 °C.

1. Pipeter 100 µl de étalons/contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37 ± 1 °C.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl du Tampon de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape!
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats.
5. Pipeter 100 µl du conjugué dans tous les puits sauf le puits Blanc A1.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20...25°C).** N'exposer pas à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25°C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Réglez le lecteur de microplaques ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur de microplaques ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le Blanc substrat, la valeur d'absorbance de cette doit être soustraire la valeur d'absorbance de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables!

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le test, les critères suivants doivent être respectés:

- **Blanc Substrat:** Valeur d'absorbance < 0,100
- **Étalon A:** Valeur d'absorbance < 0,200
- **Étalon B:** Valeur d'absorbance > 0,100
- **Étalon C:** Valeur d'absorbance > 0,500
- **Étalon D:** Valeur d'absorbance > 1,000

Étalon A < Étalon B < Étalon C < Étalon D

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

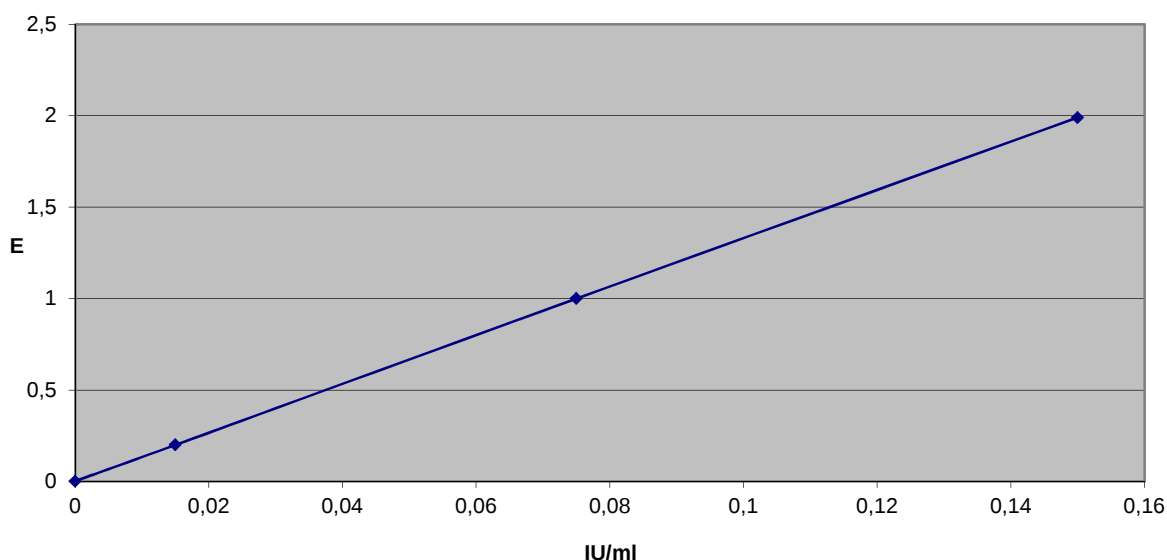
9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats quantitatifs en IU/ml, utiliser du papier millimétré bilinéaire. Inscrire les valeurs (moyennes) d'absorbance des 4 étalons A, B, C et D en ordonnées et leurs concentrations correspondantes (0,000; 0,015; 0,075 et 0,150 IU/ml) en abscisses, et dessiner une courbe d'étalonnage.

Lire les résultats (concentrations en IU/ml d'antitoxine) sur cette courbe d'étalonnage en utilisant les valeurs (moyennes) d'absorbance de chaque échantillon patient.

Pour le calcul du courbe étalonnage le mathématique fonction point à point peuvent être employées.

9.3. Courbe d'étalonnage type



9.4. Interprétation des résultats

En référence à: RKI 1999

< 0,01 IU/ml	Absence d'anticorps et de protection ! Il est recommandé de procéder immédiatement à une vaccination complète !
0,01 – 0,09 IU/ml	Taux d'anticorps faible, aucune protection fiable ! Il est recommandé d'effectuer immédiatement une injection de rappel
0,1 – 1,0 IU/ml	Protection fiable !
> 1,0 IU/ml	Protection fiable à long terme ! Un contrôle et une injection de rappel sont conseillés au bout de 10 ans environ. Il est recommandé de vérifier l'efficacité de la vaccination ou du rappel 4 à 6 semaines après l'injection et de consigner l'information dans le carnet de vaccination.

Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait prendre en considération l'histoire clinique, la symptomatologie ainsi que les données sérologiques.

Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunodéprimés et des nouveaux-nés.

10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties. Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Précision

<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (E)</u>	<u>CV (%)</u>
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
<u>Inter-essais</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (IU/ml)</u>	<u>cv (%)</u>
#1	12	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est 100,0% (95% Intervalle de confiance: 89,42% - 100,0%).

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est 100,0% (95% Intervalle de confiance: 95,44% - 100,0%).

10.4. Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique (selon CLSI EP17-A) définie comme la concentration apparente de l'analyte qui peut être distinguée de l'étalon zéro est 0,00092 IU/ml.

10.5. Interférences

Des échantillons hémolytiques ou lipémiques ou ictériques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,5 mg/ml de bilirubine.

10.6. Réaction croisée

L'étude d'un panel d'échantillons avec des anticorps dirigés contre différents paramètres interférents n'a pas révélé de preuves de résultats faussement positifs dus à des réactions croisées.

10.7. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est 0,00092 IU/ml – 0,15 IU/ml.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le ELISA est uniquement destinée à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence:	CORG0090	Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 déterminations)
------------	----------	---

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Il *Corynebacterium diphtheriae*, appartenente alla famiglia delle *Corynebacteriaceae*, è un bacillo Gram-positivo, asporigeno, aerobio e non mobile. È causa della difterite, un'infezione principalmente a trasmissione aerea che si sviluppa a livello delle prime vie respiratorie. Il batterio penetra a livello di faringe o laringe dove causa una reazione infiammatoria, fibrinoso-necrotica, con caratteristiche pseudomembrane; confinato nelle pseudomembrane, il batterio produce una tossina, che va in circolo agendo sul sistema nervoso, sul cuore, sulle ghiandole surrenali e sugli altri organi. A seconda della localizzazione delle pseudomembrane si possono avere forme diverse di difterite: angina difterica, con membrane in sede faringea; laringite difterica, più rara, in cui le membrane sono localizzate sulle corde vocali e possono portare a ostruzione laringea con soffocamento. La prognosi può essere più o meno sfavorevole con l'exitus che si verifica nel 5-10% dei casi. In caso di decesso, esso è dovuto a insufficienza respiratoria, insufficienza cardiaca o ad un accumulo di tossina nel sistema nervoso. La malattia, un tempo molto diffusa, è ormai rarissima in tutti i paesi dove è stata resa obbligatoria la vaccinazione. Nei paesi tropicali esiste anche una forma di difterite cutanea dovuta a ferite o morsi di insetti.

L'unico modo efficace per controllare la difterite è la vaccinazione profilattica con anatoxina difterica. Gli anticorpi anti-tetano proteggono contro la tossina; persone immunizzate possono essere infettati da ceppi tossigeni di difterite, ma in questi casi, le manifestazioni sistemiche di difterite non si verificano. La probabilità di guarigione migliora con il trattamento precoce ed appropriato. Diagnosi immediata è importante per garantire il trattamento precoce e adeguato con antitossina difterica.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difterite (Respiratoria)	Con malessere, mal di gola, mancanza di appetito, febbre e gonfiore del collo (Aspetto "proconsolare" o "taurino" del collo) causata dall'infiammazione. Complicazioni: danni ad altri organi per indotto dalla tossina.	La Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta. La trasmissione è aumentata in condizioni socio-economiche, di sovraffollamento e poveri.

La presenza di agenti patogeni o infezione può essere identificato mediante:

- Microscopia
- Sierologia: p.es. ELISA

2. USO PREVISTO

Il *Corynebacterium diphtheriae* toxin IgG ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per *Corynebacterium diphtheriae* toxin nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatica quantitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Micropiastre sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato a perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Corynebacterium diphtheriae toxin (IgG) micropiastre rivestita:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesivi antigenici della Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid); dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH $7,2 \pm 0,2$; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione bloccante:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH $7,2 \pm 0,2$; tappo bianco.
- **Coniugato Corynebacterium diphtheriae toxin anti IgG:** 1 fialone contenente 20 ml di anticorpi anti-IgG umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione Substrato TMB:** 1 fialone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo; < 5% NMP.
- **Corynebacterium diphtheriae toxin IgG Standards:** 4 fialoni, contenenti 2 ml, color giallo, pronto all'uso.

Standard A:	0,000	IU/ml; tappo blu
Standard B:	0,015	IU/ml; tappo verde
Standard C:	0,075	IU/ml; tappo giallo
Standard D:	0,150	IU/ml; tappo rosso

I calibratori sono calibrati in conformità con la norma dell'OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012).

Per le sostanze potenzialmente pericolose si prega di leggere la scheda di dati di sicurezza.

4.2. Accessori forniti

- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 schema della piastra

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di micropiastre
- Micropipette per l'uso tra 10-1000 µl
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25 °C) e mescolare prima di iniziare il test.

6.1. Micropiastre rivestite

Le strisce divisibili sono rivestite con antigeni della Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid). Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillate nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

6.2. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Diluire il tampone di lavaggio 1+19; per esempio 10 ml del tampone di lavaggio + 190 ml di acqua distillata. Il campione di tampone diluito è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

6.3. Soluzione Substrato TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. La soluzione deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se il substrato diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Per il CSF, si prega di utilizzare le istruzioni per l'uso ABVL0001. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con tampone diluente IgG. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone IgG e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza alle istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 12. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato) sullo schema della piastra fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1 °C.

1. Pipettare 100 µl di standard/controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il Bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
3. **Incubare 1 ora $\pm$ 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
5. Pipettare 100 µl di Coniugato in tutti i pozzetti, escludendo quello con il Bianco-substrato (Blank) A1.
6. **Incubare per 30 min a temperatura ambiente (20...25 °C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione Substrato TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio.** Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
10. Pipettare 100 µl di Soluzione bloccante in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della Soluzione Substrato TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della Soluzione bloccante.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre ELISA **a zero** usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro a zero usando il Bianco-substrato, il valore di assorbanza di questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nello schema della piastra.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda di 620 nm come misura di riferimento.

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

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Assorbanza < 0,100
- **Standard A:** Assorbanza < 0,200
- **Standard B:** Assorbanza > 0,100
- **Standard C:** Assorbanza > 0,500
- **Standard D:** Assorbanza > 1,000

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

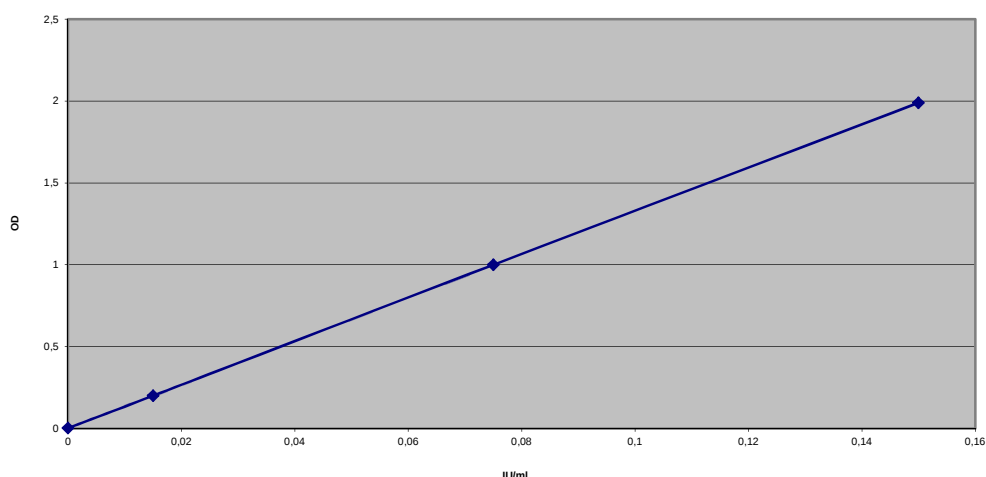
9.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere i **risultati quantitativi in IU/ml**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli standard A, B, C e D sull'asse dell'Y e ponendo le concentrazioni (0,000, 0,015, 0,075, 0,150 IU/ml) sull'asse della X su cui tracciare la curva standard.

Leggere i risultati (le concentrazioni in IU/ml) a partire di questa curva di standard, standard utilizzando i valori (medi) assorbanza campione di ogni singolo paziente e controllo.

Per calcolare la curva di standard, la "punto a punto" funzione matematica dovrebbe essere usata.

9.3. Tipica curva standard



9.4. Interpretazione dei risultati

in accordo con: RKI 1999

< 0.01 IU/ml	Livello di anticorpi non protettivo! Si raccomanda un'immediata immunizzazione di base completa!
0.01 - 0.09 IU/ml	Protezione non affidabile! Si raccomanda un immediato richiamo dell'immunizzazione.
0.1 – 1.0 IU/ml	Protezione affidabile!
> 1.0 IU/ml	Protezione a lungo termine affidabile: Dopo circa 10 anni dall'ultimo richiamo si raccomanda un controllo e un nuovo richiamo. I raccomanda che l'immunizzazione di base o il richiamo siano controllati dopo 4-6 settimane dopo l'immunizzazione e che la data sia riportata sul certificato di vaccinazione.

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test.

È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.

I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

Per ulteriori informazioni su caratteristiche del test, si prega, di contattare NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Interdosaggio	n	Media (IU/ml)	Cv (%)
#1	12	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analita specifici. La specificità diagnostica è 100,0% (95% intervallo di confidenza: 89,42% - 100,0%).

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analita specifici. La sensibilità diagnostica è 100,0% (95% intervallo di confidenza: 95,44% - 100,0%).

10.4. Sensibilità analitica

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

10.5. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici et itterici contenenti fino a 10 mg/ml di emoglobina, 5 mg/ml di trigliceridi e 0,5 mg/ml di bilirubina non hanno presentato fenomeni d'interferenza nel presente test.

10.6. Reattività crociata

Un pannello di campioni con attività anticorpali a parametri potenzialmente cross-reagenti non ha evidenziato risultati falsi positivi a causa di reazioni incrociate.

10.7. Campo di misura

Il campo di misura è 0,00092 IU/ml – 0,15 IU/ml.

11. LIMITAZIONI

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

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- Il ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche sono considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento è regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto:	CORG0090	Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 determinazioni)
----------------------	----------	---

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

Las *Corynebacterias* son bastones pleomorfos, gram positivos, inmóviles que no forman esporas y muestran como característica especial un extremo expandido. Se encuentran en muchas partes de la naturaleza, algunas especies son patógenas para animales y plantas. Aparte de habitantes no patógenos en la piel y en las mucosas del hombre, existen especies oportunistas patógenas y el causante de la difteria (*C. diphtheriae*).

Dependiendo del sitio puede manifestarse una infección después de un período de incubación de 3 a 5 días en la faringe, la nariz, los ojos, una herida, la piel, el ombligo o los genitales. La toxina lleva a una necrosis local del tejido. En la infección respiratoria se forma una membrana característica que puede obstruir el conducto del aire y ser causa letal. La infección puede extenderse por vía sanguínea a otros órganos donde es capaz de ocasionar un daño significativo. Otras complicaciones son los efectos de la toxina que puede dañar cualquier tejido (miocarditis, parálisis), hasta el fallo del sistema circulatorio como consecuencia tardía.

La difteria se da solamente en humanos y se transmite por emanaciones respiratorias de personas infectadas o portadores asintomáticos lo que ocurre en raras ocasiones. En Europa la difteria de la faringe es la más común, en los países tropicales es la difteria cutánea. La vacuna con la toxina inactivada es posible.

La única manera eficaz de controlar la difteria es la inmunización profiláctica con toxoide de la difteria. Los anticuerpos anti-tétanos protegen contra la toxina; personas vacunadas pueden ser infectados por cepas toxigénicas de la difteria, pero en estos casos, no se producen manifestaciones sistémicas de la difteria. La probabilidad de recuperación mejora con el tratamiento precoz y adecuado. Diagnóstico inmediato es importante para asegurar un tratamiento temprano y apropiado con la antitoxina diftérica.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Citomegalia (Respiratoria)	con malestar general, dolor de garganta, pérdida del apetite, fiebre de bajo grado y la hinchazón del cuello ("cuello de toro") de la inflamación. Complicaciones: daño a otros órganos inducidas por toxinas.	La transmisión de persona a persona por medio del contacto físico y respiratorio. La transmisión se incrementa en las condiciones socioeconómicas de pobreza y hacinamiento

La bacteria puede ser detectada por:

- Microscopia
- Serología: p.ej. ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima *Corynebacterium diphtheriae* toxigena IgG ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Corynebacterium diphtheriae* toxigena en suero o plasma (citratado, heparinado) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

Las microplacas 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 lector de microplacas ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Corynebacterium diphtheriae toxina IgG microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoides), en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgG de la muestra:** 1 botella de 100 ml de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15 ml de ácido sulfúrico, 0,2 mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Tampón de lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 ml de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
- **Conjugado Corynebacterium diphtheriae toxina anti-IgG:** 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.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla; < 5 % NMP.
- **Soluciones IgG de estándar (Corynebacterium diphtheriae toxina):** 4 botellas, conteniendo cada una 2 ml de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas.
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 sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

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

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

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

5. 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.

6. 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!

6.1. Microplaca recubierta

As 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 de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. 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 muestra de tampón diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °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.

6.3. 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.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Las instrucciones de uso ABVL0001 deben ser usadas para LCR. 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.

7.1. Dilución de las muestras

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

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

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 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble) en lo esquema de la placa suministrada. 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 300µl 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 sustrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25 °C).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetar 100 µl de Solución de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Ajustar el lector de microplaca (fotómetro) Elisa **al cero** utilizando **el Blanco**.

Si por razones técnicas el lector 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 en la **esquema de la placa**.

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

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

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen 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.

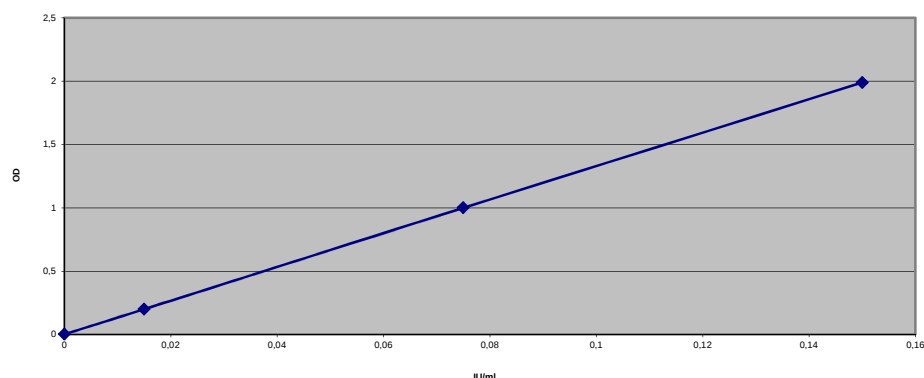
9.2. Calculo de los resultados

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 0,0000; 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.

9.3. Curva típica de estándar



9.4. 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 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.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

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

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

10.1. Precisión

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Inter ensaio	n	Média (IU/ml)	CV (%)
#1	12	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. 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 100,0% (95% Intervalo de confianza: 89,42% - 100,0%).

10.3. 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 100,0% (95% Intervalo de confianza: 95,44% - 100,0%).

10.4. 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.

10.5. Interferencias

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

10.6. 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.

10.7. Intervalo de medición

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

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

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

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y 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.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

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

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto:	CORG0090	Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 determinaciones)
------------------	----------	--

PORTUGUÊS

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do género *Corynebacterium* são bacilos Gram positivos aeróbios não esporulados de forma irregular (com 0,5 –1 µm de espessura e 2-6 µm de comprimento). Incluem agentes patogénicos oportunistas, comensais da pele e diversos agentes patogénicos principais, incluindo a *Corynebacterium diphtheriae*. Em geral, são isolados a partir de zaragatoas, em meio selectivo contendo telurite. A infecção bacteriana causada pela *C. diphtheriae*, difteria, tem duas formas. A difteria respiratória é causada por estirpes produtoras de toxinas (toxigénicas); a forma cutânea da doença pode ser causada tanto por estirpes toxigénicas como por estirpes atoxigénicas. Na forma respiratória da doença, forma-se uma membrana, que é geralmente visível na garganta ou nas amígdalas. Os doentes podem morrer por asfixia, se a membrana obstruir a respiração. Outras complicações são causadas pelos efeitos secundários da toxina da difteria (miocardite, paralisia nervosa). A difteria cutânea é geralmente moderada e consiste em feridas indistintas ou úlceras pouco profundas, e só raramente envolve complicações tóxicas (1-2 % das infecções com estirpes toxigénicas). A difteria foi uma das principais causas de mortalidade infantil na era pré-vacinação.

Após a introdução e a generalização da vacinação com toxóide de difteria (toxina da difteria inactivada em formalina) na maior parte dos países industrializados, a doença caracteriza-se agora por casos esporádicos e surtos intermitentes de baixa intensidade. Mas a amplitude de recentes epidemias de difteria em vários países da Europa de Leste chamou novamente a atenção para esta doença “esquecida”; além de que a maior parte desses casos ocorreu em adolescentes e adultos, em vez de crianças.

A única forma eficaz de controlar a difteria imunização profilática com toxóide diftérico. Os anticorpos anti-tétano proteger contra a toxina; pessoas imunizadas podem ser infectados por cepas toxigénicas de difteria, mas, nesses casos, manifestações sistêmicas da difteria não ocorrem. A chance de recuperação melhora com o tratamento precoce e adequado. Diagnóstico imediato é importante para garantir um tratamento precoce e adequado com a antitoxina diftérica.

Espécies	Doença	Sintomas (p.ex.)	Via de transmissão
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Citomegália (Respiratória)	com mal-estar, dor de garganta, perda de apetite, febre baixa e inchaço do pescoço ("pescoço de touro") de inflamação Complicações: danos a outros órgãos induzidos pela toxina.	Transmissão de pessoa para pessoa através do contato físico e respiratório. A transmissão é aumentada em condições socioeconômicas, superlotadas e de pobreza.

A presença da bactéria ou da infecção, respectivamente, pode ser identificada por

- Microscopia
- Serologia: p.ex. ELISA

2. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit *Corynebacterium diphtheriae* toxin IgG ELISA destina-se à determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG contra *Corynebacterium diphtheriae* toxin no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos.

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática quantitativa de anticorpos específicos é baseado na técnica de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As microplacas são revestidas com antígenos específicos que se ligam os anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligada, um conjugado de peroxidase de rábano (HRP) é adicionado. Este conjugado se liga aos anticorpos capturados. Num segundo passo de lavagem o conjugado não ligado é removido. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado por adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reacção azul.

A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reacção. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo.

Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um leitor de microplacas ELISA.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes fornecidos

- **Corynebacterium diphtheriae toxin (IgG) microplaca revestida:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antígeno de Corynebacterium diphtheriae toxin (toxóide), em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **Diluyente de Amostra IgG:** 1 frasco contendo 100 ml de tampão fosfato (10 mM) para diluição da amostra, pH $7,2 \pm 0,2$; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca.
- **Solução de bloqueio:** 1 frasco contendo 15 ml ácido sulfúrico; 0,2 mol/l; pronto a usar; tampa vermelha.
- **Tampão de lavagem (conc. 20x):** 1 frasco contendo 50 ml de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH $7,2 \pm 0,2$) para a lavagem dos poços; tampa branca.
- **Conjugado Corynebacterium diphtheriae toxin anti-IgG:** 1 frasco contendo 20 ml de anticorpo para IgG humana marcados com peroxidase no tampão fosfato (10 mM); de cor azul, pronto a usar; tampa preta.
- **Solução Substrato TMB:** 1 frasco contendo 15 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela; < 5 % NMP.
- **Calibradores Corynebacterium diphtheriae toxin IgG:** 4 frascos, contendo 2 ml cada (soro ou plasma humanos), de cor amarela; prontos a usar.
Calibrador A: 0,000 IU/ml; tampa azul
Calibrador B: 0,015 IU/ml; tampa verde
Calibrador C: 0,075 IU/ml; tampa amarela
Calibrador D: 0,150 IU/ml; tampa vermelha
Os calibradores são calibrados de acordo com a norma da OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012).

Para substâncias potencialmente perigosas verifique a ficha de dados de segurança.

4.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de uso
- 1 Layout da placa

4.3. Materiais e Equipamento necessários

- Leitor de microplacas ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem dos poços
- Pipetas para dispensar volumes entre 10 e 1000 µl
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

5. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo quando armazenado a 2...8 °C.

6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) misturá-los antes de iniciar o teste!

6.1. Microplaca revestidas

As tiras quebráveis são revestidas com antígeno Corynebacterium diphtheriae toxin (toxóide). Imediatamente após a remoção das tiras necessárias, as tiras restantes devem ser lacradas de novo na folha de alumínio juntamente com o saquinho de silício fornecido e armazenar a 2...8 °C.

6.2. Tampão de lavagem (conc. 20x)

Diluir o Tampão de lavagem 1+19; por exemplo. 10 ml do Tampão de lavagem + 190 ml de água destilada. A amostra do tampão diluída é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

6.3. Solução Substrato TMB

A solução está pronta para uso e tem de ser armazenada à 2...8 °C, protegida da luz. A solução deve ser incolor ou poderia ter uma ligeira coloração azul claro. Se o substrato se transforma em azul, pode ter sido contaminado e não pode ser usado no teste.

7. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato, heparina) humanos. Para LCR, por favor utilize a instrução de uso ABVL0001. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente. Não é recomendada a inativação por calor das amostras.

7.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 100 com Diluente de Amostra IgG. Dispensar 10 µl de amostra e 1 ml de Diluente de Amostra IgG em tubos para obter uma diluição 1 + 100 e misturar meticulosamente com um vortex.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

8.1. Preparação do Teste

Por favor, ler atentamente as instruções de uso **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao as instruções de uso, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três para cinco e o volume do Tampão de lavagem de 300 µl para 350 µl para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 12. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido no Layout da placa fornecida no kit. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

1. Dispensar 100 µl dos calibradores/controles e das amostras diluídas nos poços respectivos. Deixar o poço A1 vazio para o branco substrato.
2. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
3. **Incubar durante 1 hora ± 5 min a 37 ± 1 °C.**
4. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço três vezes com 300 µl de Tampão de lavagem. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!
Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.
5. Dispensar 100 µl de Conjugado em todos os poços, excepto no poço do Branco substrato A1.
6. **Incubar durante 30 min à temperatura ambiente (20...25°C).** Não expor diretamente à luz solar.
7. Repetir a etapa 4.
8. Dispensar 100 µl de Solução Substrato TMB em todos os poços.
9. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25°C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
10. Dispensar 100 µl de Solução de bloqueio em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a Solução Substrato TMB, desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
11. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição da solução de bloqueio.

8.2. Medição

Ajustar o Leitor de Microplacas ELISA a zero usando o **Branco substrato**.

Se - devido à razões técnicas – o leitor ELISA não puder ser ajustado a zero usando o Branco substrato, valor da absorvância deste deve ser subtraído de todos os outros valores de absorvância medidos de forma a obter resultados fiáveis!

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra no Layout da placa.

É recomendado fazer a medição dicromática usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular os valores médios de absorvância.

9. RESULTADOS

9.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, devem ser cumpridos os seguintes critérios:

- **Blanco:** Valor de Absorvância < **0,100**
- **Calibrador A:** Valor de Absorvância < **0,200**
- **Calibrador B:** Valor de Absorvância > **0,100**
- **Calibrador C:** Valor de Absorvância > **0,500**
- **Calibrador D:** Valor de Absorvância > **1,000**

Calibrador A < Calibrador B < Calibrador C < Calibrador D

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

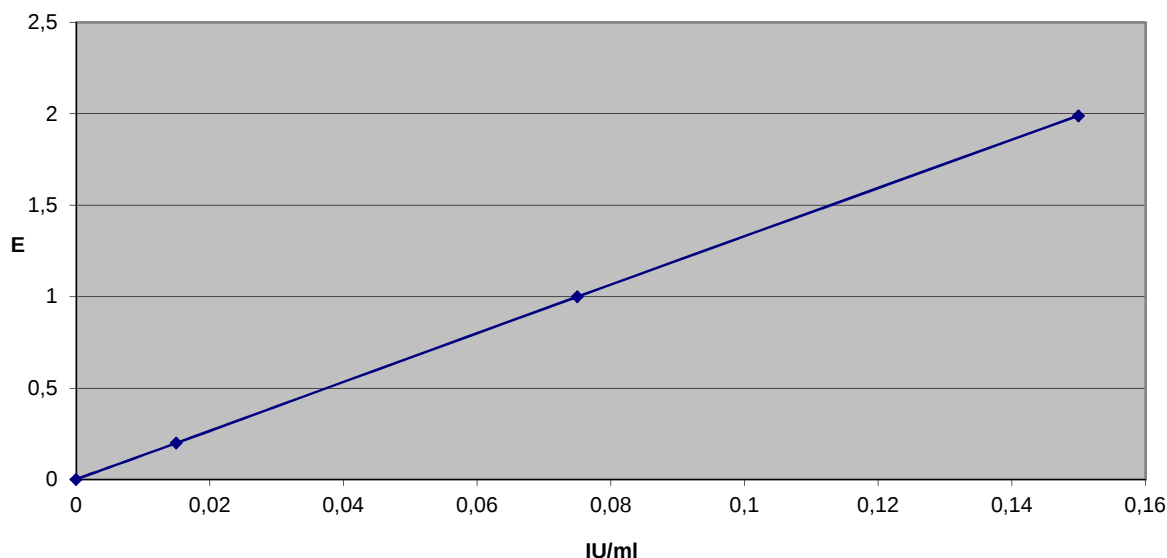
9.2. Cálculo dos Resultados

Para obter resultados quantitativos em IU/ml coloque os valores (médios) de absorvância dos 4 standards A, B, C e D em papel para gráficos (milimétrico) num sistema de coordenadas contra as suas respectivas concentrações (0,000; 0,015; 0,075 e 0,150 IU/ml) e desenhe uma curva de calibração normal (valores de absorvância no eixo vertical dos y, concentrações do eixo horizontal dos x).

Leia os resultados a partir desta curva de standard utilizando os valores (médios) de absorvância para cada amostra de paciente.

Para calcular a curva de standard, a função matemática ponto a ponto deve ser usada.

9.3. Curva de standard típica



9.4. Interpretação dos Resultados

de acordo com: RKI 1999

< 0,01 IU/ml	Nível de anticorpos insuficiente para protecção! É recomendada a administração imediata do esquema completo de imunização primária!
0,01 – 0,09 IU/ml	Protecção não fiável! É recomendada administração imediata de dose de reforço.
0,1 – 1,0 IU/ml	Protecção fiável!
> 1,0 IU/ml	Protecção duradoura fiável: Cerca de 10 anos após o último reforço, é recomendada uma verificação de imunidade e a administração de nova dose de reforço. É recomendada uma verificação da imunização primária ou de reforço, 4 a 6 semanas depois da imunização, e o registo dos dados no certificado de vacinação.

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos. Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.

10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

Para mais informações sobre as características de desempenho específicas, por favor, entre em contato NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Precisão

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Inter ensaio	n	Média (IU/ml)	CV (%)
#1	12	7,83	12,95
#2	12	34,47	6,99
#3	12	35,39	6,86

10.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico. É de 100,0% (95% Intervalo de confiança: 89,42% - 100,0%).

10.3. Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser positivo na presença do analito específico. É de 100,0% (95% Intervalo de confiança: 95,44% - 100,0%).

10.4. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (segundo CLSI EP17-A) – definida como a concentração aparente do analito que pode ser distinguida do calibrador zero – é 0,00092 IU/ml.

10.5. Interferências

Não são observadas interferências com amostras hemolisadas, lipémicas ou ictericas até uma concentração de hemoglobina de 10 mg/ml, de triglicédeos de 5 mg/ml e de bilirrubina de 0,5 mg/ml.

10.6. Reacção cruzada

A investigação do painel de amostras com atividades de anticorpos em parâmetros com potencial de reacção cruzada não revelou nenhuma evidencia de resultados falso-positivos devido a reacções cruzadas.

10.7. Intervalo de medição

O intervalo de medição é 0,00092 IU/ml – 0,15 IU/ml.

11. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

12. PRECAUÇÕES E AVISOS

- Em cumprimento com o artigo 1 parágrafo 2b da directiva Europeia 98/79/EC o uso de dispositivos médicos para diagnóstico in vitro destina-se segundo o fabricante a assegurar adequabilidade, desempenhos e segurança do produto. Portanto o procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções para utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e juntar reagentes ou tiras de lotes de produção diferentes.
- nenhuns reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
- O ELISA foi desenhado apenas para pessoal qualificado e que esteja familiarizado com boas práticas laboratoriais.

12.1. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

Prod. No.: CORG0090 Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA (96 Determinações)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAFIA

CDC (1993): Diphtheria Outbreak -- Russian Federation, 1990-1993. In *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 42 (43), pp. 840–847.

Hofmann, F.; Schuh, F.; Michaelis, M.; Stossel, U. (1994): Zur Akzeptanz von Schutzimpfungen bei Ärzten und bei der Allgemeinbevölkerung. In *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 56 (7), pp. 371–376.

Robert Koch Institut (RKI) (1995): Impfempfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO). Stand: Oktober 1994. In *Bundesgesundheitsblatt* 3, 108-114.

Robert Koch Institut (RKI) (1999): Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis. Ergebnisse einer Seroprävalenzstudie in Deutschland. In *Epidemiologisches Bulletin* 1/99.

Stickings, Paul; Rigsby, Peter; Coombes, Laura; Hunolstein, Christina von; Ralli, Luisa; Pinto, Antonella; Sesardic, Dorothea (2013): Calibration and commutability assessment of the 1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human. In *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 41 (6), pp. 384–392. DOI: 10.1016/j.biologicals.2013.08.001.

Wharton, Melinda (2006): Diphtheria. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 389–393.

World Health Organization (WHO) (1993): Expanded Programme on Immunization. Outbreak of diphtheria, update. In *Weekly Epidemiological record* 19, 134-138.

World Health Organization (WHO) (1994): Expanded Programme on Immunization. Diphtheria epidemic. In *Weekly Epidemiological record* 34, 253-258.

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

NMP	N-Methyl-2-pyrrolidone
-----	------------------------

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE Mark / CE-Zeichen / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Arbeitsanleitung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microplate / Mikrotiterplatte / Microplaque / Micropiastra / Microplaca / Microplaca
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
CAL	Standard or Calibrator A-D / Standard oder Kalibrator A-D / Standard o Étalon A-D / Standard o Calibratore A-D / Estándar o Calibrador A-D / Standard ou Calibrador A-D
DIL G	IgG Sample Diluent / IgG-Probenverdünnungspuffer / Diluant pour échantillon IgG / Tampone diluente IgG / Diluyente para IgG de la muestra / Diluente de Amostra IgG
SOLN STOP	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'arrêt / Soluzione bloccante / Solución de parada / Solução de bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate solution / TMB-Substratlösung / Solution de substrat TMB / Soluzione substrato TMB / Solución de sustrato de TMB / Solução substrato TMB
WASH BUF 20x	Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de lavage concentré 20 x / Tampone di lavaggio concentrazione x20 / Tampón de lavado concentrado x20 / Tampão de lavagem concentrada 20x
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes

SCHEME OF THE ASSAY

Corynebacterium diphtheriae toxin IgG ELISA

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Sample (1+100 diluted)
Standard A	-	100µl	-	-	-	-
Standard B	-	-	100µl	-	-	-
Standard C	-	-	-	100µl	-	-
Standard D	-	-	-	-	100µl	-
Sample (1+100 diluted)	-	-	-	-	-	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)						

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Waldstraße 23 A6
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

CORG0090engl,dt,fr,it,es,port-05072017-JV-gr.Lot089