

Certificate

Quality Management System
EN ISO 13485:2016

Registration No.: SX 1624072-1

Organization: Seramun Diagnostica GmbH
Spreenhagener Str. 1
15754 Heidesee
Germany

Scope: Design and development, manufacture and distribution of in-vitro diagnostics and laboratory systems, consisting of laboratory equipment and associated analysis software, for the detection of autoimmune diseases and infectious diseases

Design and development, manufacture and distribution of substrates and protein stabilizers for in-vitro diagnostics, as well as antibody production and contract development

TÜVRheinland

The Certification Body of TÜV Rheinland LGA Products GmbH certifies that the organization has established and applies a quality management system for medical devices. Proof has been furnished that the requirements specified in the abovementioned standard are fulfilled. The quality management system is subject to yearly surveillance.

Report No.: 3324901-90
Effective date: 2021-03-10
Expiry date: 2024-03-09
Issue date: 2021-03-03

A. Fechner



Dipl.-Ing. A. Fechner

TÜV Rheinland LGA Products GmbH
Tillystraße 2 · 90431 Nürnberg · Germany



Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A+B

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Clostridium difficile* Toxin A+B
in Stuhlproben und Kultursuspensionen

 E-040  96  E-040-A2  2x 96  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Clostridium difficile gilt als der kausale Auslöser nosokomialer Diarrhoen bei Erwachsenen während oder nach einer Antibiotikabehandlung, insbesondere mit Cephalosporinen der dritten Generation (1). Obwohl 2 - 3% gesunder Erwachsener und 20 - 50% gesunder Kinder mit *Clostridium difficile* besiedelt sind, erfolgt eine Infektion in der überwiegenden Zahl der Fälle über exogene Quellen, wie z. B. Krankenhauspersonal oder durch *C. difficile* Sporen kontaminierte Gegenstände (Toiletten, Bettwäsche, etc.). Die beiden Exotoxine A und B dieses anaeroben, sporenbildenden Bakteriums verursachen die Depolymerisation von Aktin-Filamenten durch intrazelluläre enzymatische Modifikation von rho-Proteinen. Die Folge ist eine erhöhte Zellpermeabilität mit Invasion von Neutrophilen, was schließlich zur Ausprägung des klinischen Bildes der so genannten Antibiotika assoziierten Diarrhoe, der Antibiotika assoziierten Colitis (AAC) bis hin zur pseudomembranösen Colitis (PMC) führen kann (1). Aufgrund des kausalen Zusammenhangs zwischen Toxinproduktion und Erkrankung erfolgt die Diagnostik einer *Clostridium difficile* Infektion vorwiegend über den direkten Toxinnachweis aus Stuhlproben. Dabei haben immunologische Verfahren, wie z. B. Enzymimmunoassays, die beide Toxine nachweisen können, den als Goldstandard geltenden Cytotoxizitätstest inzwischen weitgehend abgelöst (2).

Literatur:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special - Updates on Clostridium difficile" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

Anwendungsbereich

Der **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B** ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben und Kultursuspensionen.

Testprinzip

Der **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B** ist ein indirekter Zwei-Seiten-Assay auf der Basis polyklonaler und monoklonaler Antikörper gegen die Toxine A und B von *Clostridium difficile*.

Verdünnte unbehandelte Stuhlproben oder Kultursuspensionen sowie negative und positive Kontrollproben werden, in die mit monoklonalen anti-Toxin A- und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt und biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper in die Kavitäten dispensiert. Nach erneuter Inkubation werden die ungebundenen biotinylierten Antikörper in einem Waschschrift entfernt. Die gebundenen biotinylierten Antikörper reagieren in einem weiteren Inkubationsschritt mit Streptavidin-Peroxidase (POD)-Konjugat.

Nach erneutem Waschen setzt die POD im folgenden enzymatischen Reaktionsschritt die farblose Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt um. Diese Reaktion wird nach der Inkubation durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die bei 450 nm / ≥ 620 nm gemessene optische Dichte (OD) des Endprodukts ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Toxin-Antigene direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2 x 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen anti-Toxin A- (Maus) und polyklonalen anti-Toxin B-Antikörpern (Kaninchen)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung rot vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat für 2x 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL 	Positive Kontrolle <i>C. difficile</i> Toxin reaktive Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL 	Negative Kontrolle <i>C. difficile</i> Toxin negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6/1	CONJ BIOTIN	Biotin-Konjugat Biotinylierte, polyklonale anti-Toxin A- (Kaninchen) und monoklonale anti-Toxin B-Antikörper (Maus)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt weiße Kappe	30 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt weiße Kappe
6/2	CONJ STREPT	Streptavidin- POD-Konjugat	15 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt braune Kappe	30 ml · gebrauchsfertig rot gefärbt braune Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe	28 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe	28 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Testansatz aus Stuhlsuspensionen

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht werden, oder bei mindestens -20°C eingefroren werden. Eine Lagerung bei -20°C ist aufgrund der Gefahr des Toxinabbaus ebenso wenig zu empfehlen wie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben. Formalin behandelte Stuhlproben sollten nicht verwendet werden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*[®] Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 h bei 2...8°C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Testansatz aus Kultursuspensionen (toxigene Kultur)

Über 48 h auf Blut- oder CCFA-Agar gewachsene *Clostridium difficile* Kolonien können direkt im *Serazym*[®] ELISA auf Toxin A+B untersucht werden. Hierzu ist eine Bakteriensuspension herzustellen, deren Dichte Mc Farland Standard 1 entspricht (OD bei 600 nm = 0,2 bis 0,25 nach Nullabgleich gegen das gelbe *Serazym*[®] Verdünnungsmedium):

In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren.

2 - 4 Impfösen *C. difficile* Kolonien abnehmen und in das Verdünnungsmedium einrühren.

Probe durch kräftiges Schütteln auf einem Vortex-Gerät resuspendieren, ggf. Bakteriendichte durch Trübungsmessung bei 600 nm prüfen (s.o.). 100 µl der Suspension direkt im ELISA einsetzen.

Bei Verwendung von Selektivmedien kann die nachweisbare Toxinmenge in Abhängigkeit von den in diesen Medien enthaltenen Hemmstoffen reduziert sein, was zu (im Vergleich zu Vollmedien) verringerten OD-Werten im ELISA führen kann. Bei toxigener Kultur von Selektivmedien muss daher auf Einsatz einer ausreichend hohen Bakteriendichte geachtet werden, die mindestens Mc Farland Standard 4 (OD 600 nm > 1,0 nach Nullabgleich gegen das gelbe *Serazym*[®] Verdünnungsmedium) entspricht. Zum Erreichen dieser Bakteriendichte ist die Resuspendierung der *C. difficile* Kolonien von mindestens einer halben, dicht bewachsenen Platte erforderlich.

Gegebenenfalls ist den Empfehlungen und Angaben der Medium-Hersteller zu folgen, die Angaben zum Einfluss der in den entsprechenden Medien verwendeten Zusätze auf die Toxinproduktion und damit zur prinzipiellen Eignung eines Mediums für die toxigene Kultur machen können.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Horizontalschüttler bei Abarbeitung nach Variante 2

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Der *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B kann in zwei Varianten abgearbeitet werden:

1. Variante: Inkubation ohne Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 2 Stunden 15 Minuten
2. Variante: Inkubation mit Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 1 Stunde 15 Minuten

Stuhlproben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg Stuhlprobe + 1,0 ml Verdünnungsmedium (3), bzw. 2 - 4 Impfösen einer *C. difficile* Kultur in 1,0 ml Verdünnungsmedium (3) resuspendieren.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte Variante 1 (ohne Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe oder Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat (6/1) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** Streptavidin-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 30 min bei RT inkubieren.
10. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
12. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
13. 3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Arbeitsschritte Variante 2 (mit Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe oder Kultursuspension** pipettieren.
3. Platte abkleben und 30 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
4. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
5. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** Biotin-Konjugat (6/1) pro Kavität.
6. Platte abkleben und 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
7. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
8. 3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** Streptavidin-POD-Konjugat (6/2) pro Kavität.
9. Platte abkleben und 15 Minuten bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 - 700/min inkubieren.
10. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
11. 3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
12. 15 min lichtgeschützt bei RT inkubieren (nicht schütteln).
13. 3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
14. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,20

Proben mit OD Werten, die über der errechneten Grenzwert OD liegen, sind als reaktiv, Proben mit einer OD, die mehr als 10 % unter der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als nicht reaktiv zu bewerten. Proben mit OD, die innerhalb von 10 % unterhalb der errechneten Grenzwert-OD liegen, sind als grenzwertig zu beurteilen und müssen wiederholt getestet werden. Gegebenenfalls ist eine zweite Stuhlprobe der entsprechenden Patienten anzufordern.

Referenzwert

Serazym® C. difficile Toxin A+B	
Positiv	> Cut-off
Grenzwertig	0,9 x Cut-off – Cut-off
Negativ	< 0,9 x Cut-off

Aufgrund von Unterschieden im Einsender Klientel (Krankenhäuser, niedergelassene Ärzte etc.) wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle $\leq 0,20$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle $\geq 1,00$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

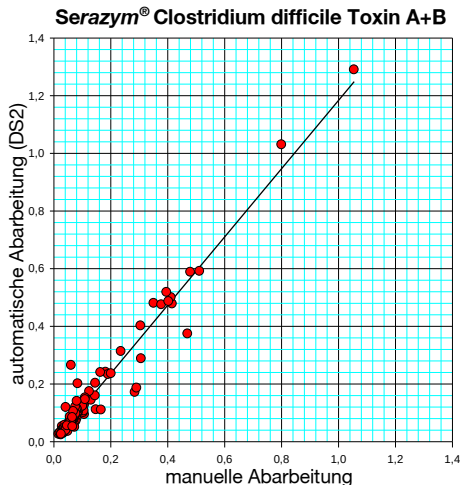
Der qualitative enzymimmunologische Nachweis der Toxine A und B von *Clostridium difficile* in Stuhlproben lässt keine Korrelation zwischen gemessener OD und Schweregrad der Infektion zu. Die OD der Proben darf auch nicht mit der OD der positiven Kontrolle in Korrelation gesetzt werden. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung, ungenügende Homogenisierung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Formalin behandelte Proben können falsch positive Werte hervorrufen und dürfen daher im Test nicht eingesetzt werden. Ein negatives Ergebnis im *Serazym*® *Clostridium difficile* Toxin A+B schließt eine Infektion nicht aus. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit dem Erregernachweis und der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*® *Clostridium difficile* Toxin A+B auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Einprogrammierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Bei der parallelen Untersuchung von 125 Stuhlproben in manueller und automatischer Abarbeitung (DS2, Dynex Technologies) konnte ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,976$ ermittelt werden.



Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B* aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,386	0,042	3,0
2	0,506	0,017	3,3
3	0,332	0,028	8,5

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK) im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B* in 5 unterschiedlichen Testläufen an zwei Tagen aus 8-fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standard-abweichung	VK (%)
1	1,321	0,102	7,7
2	0,485	0,034	6,9
3	0,345	0,037	10,8

Spezifität und Sensitivität

Im Rahmen einer Studie wurden insgesamt 154 Stuhlproben parallel im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B* und einem anderen kommerziellen ELISA untersucht.

	Vergleichs ELISA positiv	Vergleichs ELISA negativ
<i>Serazym® ELISA positiv</i>	103	4
<i>Serazym® ELISA negativ</i>	2	45

Spezifität: 91,8% · Sensitivität: 98,0%

Kreuzreaktivität

Die Untersuchung von Stuhlproben mit einem positiven Erregernachweis der folgenden Bakterien-Spezies ergab keine falsch positiven Ergebnisse im *Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B*: *Staphylococcus aureus*, nicht Enterotoxin bildend; *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin bildend; EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^6$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym® ELISA* negativ getestet (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)

<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Seroovar enteritidis	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Seroovar typhimurium	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)

Der getestete Stamm von *Clostridium sordellii* (ATCC 9714) zeigte keine Kreuzreaktivität im *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B. In der Literatur sind Kreuzreaktivitäten von anti-C. difficile Toxin Antikörpern mit *C. sordellii* Toxinen bestimmter Stämme beschrieben.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazym*® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2020-07-21	Testkomponenten	Korrektur
	Vorbereitung und Lagerung der Proben	Aktualisierung
	Testdurchführung	Aktualisierung
	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung
	Änderungshistorie	Einführung des Abschnittes "Änderungshistorie"

Inkubationsschema Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B (E-040)

1.  100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** bzw. **Kultursuspension** pipettieren
 60 min Inkubation (RT) **alternativ: 30 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min Inkubation (RT) **alternativ: 15 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
3.  3 Tropfen (oder 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min Inkubation (RT) **alternativ: 15 min unter Schütteln**
 5 x Waschen mit Waschlösung
4.  3 Tropfen (oder 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min Inkubation (lichtgeschützt bei RT) ohne Schütteln
5.  3 Tropfen (oder 120 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / $\geq$ 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Clostridium difficile Toxin A+B

Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* Toxin A and B
in stool specimens and culture suspensions

REF E-040  96 REF E-040-A2  2x 96  *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Clostridium difficile is a bacterium causing nosocomial diarrhea in adults during or after the treatment with antibiotics such as 3rd generation cephalosporines (1). Although 2 - 3% of healthy adults and 20 - 50% of healthy children are colonized with *Clostridium difficile*, the infection is usually of exogenous origin and results from the contact either to hospital staff or to *Clostridium difficile* spores which may contaminate toilets, bed clothes etc. Both exotoxins A and B of this spore-forming bacteria cause the depolymerisation of actin filaments due to the intracellular enzymatic modification of rho-proteins. Consequently, the permeability of cell membrane is raised and neutrophils may invade leading to expression of the clinical picture of the so-called *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis or finally the pseudomembranous colitis (PMC) (1). As the production of toxins and the outbreak of disease is correlated, diagnosis of *Clostridium difficile* infection is based mainly on a direct detection of the toxins in stool specimens. To date the cytotoxicity test has been considered as the gold standard for detection of *Clostridium difficile* toxins. Recently it has been replaced to a large extent by immunological tests such as enzyme immunoassay (2).

References:

1. Rambaud J-C., LaMont J-T. (Hrsg.): "Ökosystem Darm Special - Updates on *Clostridium difficile*" Springer Verlag 1995
2. Wilkins T.D. and Lyerly D.M. (2003): „*Clostridium difficile* Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 2, p. 531-534

Intended Use

The **Serazym® Clostridium difficile Toxin A+B** is an *in-vitro*-diagnostic medical device for direct detection of the toxins A and B of *Clostridium difficile* in stool specimens and culture suspensions.

Principle of The Test

Serazym® Clostridium difficile Toxin A + B is an indirect two-site-immunoassay for the qualitative determination of both *Clostridium difficile* toxins A and B based on polyclonal and monoclonal antibodies. *Clostridium difficile* toxins of stool specimens or culture suspensions and the positive control react with monoclonal anti-toxin A and polyclonal anti-toxin B antibodies coated on the solid phase of the microplate. After incubation non-bound material is removed by a washing step. Subsequently bound toxins specifically react with biotinylated polyclonal anti-toxin A and monoclonal anti-toxin B antibodies during a second incubation period. Non-bound material is separated from the solid-phase immune complexes by a subsequent washing step. During the next incubation period horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin reacts with the bound biotinylated antibodies. Unbound conjugate is removed by a washing step. HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / $\geq$ 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of *Clostridium difficile* toxin A and B. After consideration of the cut-off value, results are interpreted as positive or negative.

Test Components

			For 96 Wells	For 2x 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with monoclonal anti-Toxin A- (mouse) and polyclonal anti-Toxin B-antibodies (rabbit)	12 single breakable 8-well strips colour coding red vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding red vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap	2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	100 ml · ready to use coloured yellow black cap	2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control <i>C. difficile</i> Toxin reactive sample	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap	4.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control <i>C. difficile</i> Toxin negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6/1	CONJ BIOTIN	Biotin-conjugate Biotinylated, polyclonal anti-Toxin A- (rabbit) and monoclonal anti-Toxin B-antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green white cap	30 ml · ready to use coloured green white cap
6/2	CONJ STREPT	Streptavidin-HRP-conjugate	15 ml · ready to use coloured red brown cap	30 ml · ready to use coloured red brown cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap	28 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap	28 ml · ready to use yellow cap

Preparation And Storage Of Samples

Toxin detection from stool specimens

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours or frozen at at least -20°C. Storage at -20°C as well as repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Formalin-preserved stool samples should not be used in this assay. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8°C before testing in the ELISA.

Preparation

Warm samples to room temperature and mix thoroughly. Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or pipette 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. If necessary spin down floating particles in a micro centrifuge at maximum speed for 1 min.

Toxin detection from culture suspensions (toxigenic culture)

Colonies of *Clostridium difficile* grown on blood or CCFA agar for 48 hours can be tested directly in the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B. Prepare a bacterial suspension according to Mc Farland standard 1 (OD value at 600 nm: 0.20 - 0.25 after zero compensation to the yellow coloured *Serazym*[®] sample diluent):

Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube.

Transfer 2 - 4 inoculating loops of a *C. difficile* culture into the sample diluent and suspend on a vortex mixer. Read OD value at 600 nm as described above where required.

Use 100 µl for ELISA testing. If selective culture media are used the detectable amount of toxins may be reduced due to inhibitory components of such media resulting in decreased OD values in the ELISA. Therefore using selective media for toxigenic culture requires the preparation of a bacterial suspension at least according to Mc Farland standard 4 (OD 600 nm > 1.0 after zero compensation to the yellow coloured *Serazym*[®] sample diluent). In this case the *Clostridium difficile* colonies of at least half of a densely grown agar plate have to be harvested. Where required the recommendations and instructions of the medium manufacturers are to be observed.

Materials Required But Not Provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · Reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer or 8-channel pipette · microplate reader with optical filters for 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation · orbital shaker for performance of test variant 2

Preparation And Storage Of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 96 or 2x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

The *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B can be performed in two ways:

1. Incubation without shaking; complete test duration 2 hours and 15 minutes
2. Incubation with shaking; complete test duration 1 hour and 15 minutes

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6, e.g. 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml sample diluent (3) or transfer 2 - 4 inoculation loops of a *C. difficile* colony into a tube with 1.0 ml sample diluent (3) and mix thoroughly on a vortex.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle!

Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps variant 1: without shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen or culture suspension.**
3. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** biotin-conjugate (6/1) per well.
6. Cover plate and incubate for 30 min at RT.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** streptavidin-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 30 min at RT
10. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
11. Dispense 3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
12. Incubate for 15 min at RT protected from light.
13. Dispense 3 drops (or 120 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
14. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Working steps variant 2: with shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted stool specimen or culture suspension.**
3. Cover plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
4. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
5. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** biotin-conjugate (6/1) per well.
6. Cover plate and incubate for 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
7. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
8. Dispense 3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** streptavidin-HRP-conjugate (6/2) per well.
9. Cover plate and incubate for 15 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500-700/min.
10. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
11. Dispense 3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
12. Incubate for 15 min at RT without shaking protected from light.
13. Dispense 3 drops (or 120 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
14. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result Interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.20

Samples with absorbances higher than the cut-off value are considered positive, samples with absorbances 10% below the cut-off value are considered negative for *Clostridium difficile* toxin A and B antigen. Samples within 10 % below the cut-off up to the cut-off value have to be considered borderline and should be repeatedly tested. In case of repeated borderline result a second sample of the corresponding patient should be investigated.

Reference Values

Serazym® C. difficile Toxin A+B	
Positive	> Cut-off
Borderline	0,9 x Cut-off – Cut-off
Negative	< 0,9 x Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is ≤ 0.20 (manual performance)
 ≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 1.00

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

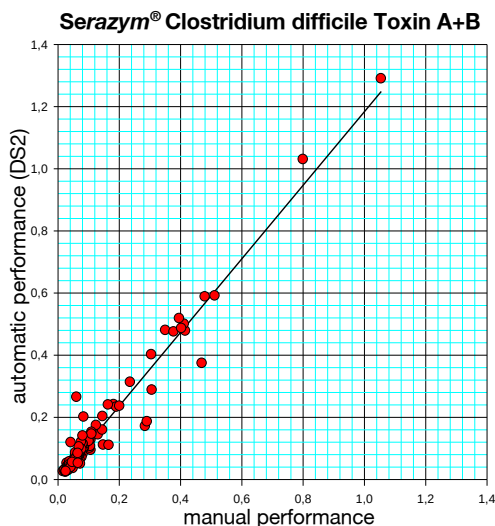
There is no correlation between measured absorbance and seriousness of the infection. It is also not allowed to correlate absorbances of the samples with that of the positive control. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions, not sufficiently homogenized samples or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. Formalin treated samples may cause false positive results. A negative test result in the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B does not exclude an infection: The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] Clostridium difficile Toxin A+B on fully automated microplate processors (e.g. DS2, DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x-8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 125 stool specimens was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.976$.



Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym®* Clostridium difficile Toxin A+B calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.386	0.042	3.0
2	0.506	0.017	3.3
3	0.332	0.028	8.5

Inter-assay coefficient of variation (CV) in the *Serazym®* Clostridium difficile Toxin A+B in 5 different test runs on 2 different days from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.321	0.102	7.7
2	0.485	0.034	6.9
3	0.345	0.037	10.8

Specificity and sensitivity

A total of 154 stool specimens were tested in parallel with the *Serazym®* Clostridium difficile Toxin A+B and another commercially available ELISA.

	comparative ELISA positive	comparative ELISA negative
<i>Serazym®</i> ELISA positive	103	4
<i>Serazym®</i> ELISA negative	2	45

Specificity: 91.8% · Sensitivity: 98.0%

Cross reactivity

Faecal samples positive for one of the following intestinal bacteria did not show any cross reaction in the *Serazym®* Clostridium difficile Toxin A+B:

Staphylococcus aureus, enterotoxin negative; *Staphylococcus aureus*, enterotoxin positive; EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhimurium*; *Salmonella enteritidis*; *Salmonella spec.* *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas caviae*; *Campylobacter spec.*; *Hafnia alvei*; *Yersinia enterocolitica* O:3.

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym®* ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)

<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Serovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)

The *C. sordellii* strain ATCC 9714 did not cross react in the *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B although some publications describe cross reactivities of toxins of some *C. sordellii* strains with anti-*C. difficile* toxin antibodies.

Common Advices And Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*® stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!

Note safety precautions of the single test components!



History Of Changes

Version	Section	Modifications
2020-07-21	Intended Use	Correction
	Test Components	Correction
	Preparation And Storage Of Samples	Update
	Assay Procedure	Update
	Common Advices And Precautions	Update
	History of Changes	New section "History of Changes"

Incubation Scheme *Serazym*® Clostridium difficile Toxin A+B (E-040)

1. 

pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **diluted stool specimen** or culture suspension
 60 min incubation (RT) **alternatively 30 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
2. 

3 drops (or 120 µl) **CONJ BIOTIN** (6/1)
 30 min incubation (RT) **alternatively 15 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
3. 

3 drops (or 120 µl) **CONJ STREPT** (6/2)
 30 min incubation (RT) **alternatively 15 min while shaking**
 5 x wash with wash solution
4. 

3 drops (or 120 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 15 min incubation protected from light (RT) **without shaking**
5. 

3 drops (or 120 µl) **STOP** (8)

Read OD at 450 / ≥ 620 nm



Manufacturer



Date of manufacture



Use by



Batch code



Catalog number



Keep away from sunlight



Temperature limits



Biological risks



Do not reuse



Consult instructions for use



Caution



In-vitro-diagnostic medical device



Contains sufficient for <n> tests

Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzymimmunoassay zum Nachweis von *Clostridium difficile* GDH in Stuhlproben

REF E-107  96 REF E-107-A2  2x 96 IVD *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Sprehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Der anaerobe Sporenbildner *Clostridium difficile* gilt weltweit als wichtigster Auslöser nosokomialer Diarrhoen, die sich vor allem unter Antibiotikatherapie entwickeln. Der Schweregrad der Erkrankung ist u.a. in Abhängigkeit von der Grunderkrankung des betroffenen Patienten und von der Pathogenität des verursachenden *C. difficile* Stamms unterschiedlich ausgeprägt und kann von blutig-schleimiger Diarrhoe über Colitis und Pseudomembranöse Colitis bis hin zum toxischen Megacolon führen. Für die Ausbildung von Symptomen sind die Toxine A und B ursächlich verantwortlich. Die meisten *Clostridium difficile* Stämme produzieren beide Toxine, einige aber auch nur das Toxin B. Atoxigene Stämme, die nicht die Fähigkeit zur Toxinbildung haben, gelten als apathogen und sind daher diagnostisch irrelevant. Ein als „common antigen“ bezeichnetes Enzym, die Glutamatdehydrogenase (GDH), wird sowohl von toxischen als auch von atoxigenen Stämmen produziert. Da die natürliche Besiedlung des menschlichen Darms mit *Clostridium difficile* bei gesunden Erwachsenen 2 - 3% und bei Kindern bis zu 50% betragen kann, ist für die Diagnose *Clostridium difficile* assoziierter Erkrankungen allein der Toxinnachweis zur Identifikation toxischer Stämme ausschlaggebend.

Seit einigen Jahren zeichnet sich eine Veränderung der epidemiologischen Situation ab, denn es erkranken zunehmend auch jüngere und nicht hospitalisierte Patienten an einer *C. difficile* assoziierten Diarrhoe. Eine Zunahme schwerer Verläufe, verursacht durch hochvirulente Stämme, wird ebenfalls beobachtet, so dass der Nachweis eines Trägerstatus zur epidemiologischen Überwachung sinnvoll sein kann. In der Labor-Diagnostik haben sich verschiedene Vorgehensweisen etabliert. In der Regel erfolgt der Nachweis der Toxine A und B direkt aus Stuhl oder aus einer Voranreicherungskultur mittels Enzymimmunoassay. Daneben hat sich ein Zweistufen-Ablauf etabliert, der das Screening auf *C. difficile* über den Nachweis der GDH und den anschließenden Nachweis GDH positiver Proben auf Vorhandensein der Toxine A und B zum Ausschluss toxischer Stämme umfasst.

Der alleinige Nachweis von GDH ist weder zur Diagnosestellung einer *C. difficile* assoziierten Durchfallerkrankung noch für eine Therapieentscheidung ausreichend, sondern muss immer durch die Bestimmung der Toxine A und B ergänzt werden.

Literatur:

1. Wilkins TD and Lyerly DM (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No.2, p531-534
2. Von Eichel-Streiber C und Braun V (2008): „Das difficile Clostridium“ Journal Of Laboratory Medicine, Vol. 32, No. 4, p219-234
3. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD (1991): “Identification of the latex test-reactive protein of Clostridium difficile as glutamate dehydrogenase.” Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 29, p2639-2642.
4. Zhen L, Keller SF, Lyerly DM et al. (2004): „Multicenter Evaluation of a New Screening Test That Detects Clostridium difficile in Faecal Specimens“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 42, No. 8, p3837-3840.
5. Peterson LR and Robicsek A (2009): “Does My Patient Have Clostridium difficile Infection?” Annals of Internal Medicine, Vol. 151, No. 3, p176-180.

Anwendungsbereich

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein *in-vitro*-Diagnostikum zum direkten Nachweis der Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Clostridium difficile* in Stuhlproben.

Testprinzip

Serazym® Clostridium difficile GDH ist ein Ein-Schritt Enzymimmunoassay auf der Basis poly- und monoklonaler Antikörper gegen die Glutamatdehydrogenase (GDH) von *Clostridium difficile*. Verdünnte unbehandelte Stuhlproben und Peroxidase-(POD)-markierte monoklonale anti-GDH-Antikörper werden simultan in die mit polyklonalen anti-GDH-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotitrationsstreifen dosiert. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die ungebundenen Komponenten durch einen Waschschrift entfernt. Alternativ kann die erste Inkubation unter Schütteln auf 30 min verkürzt werden. Im anschließenden 10 minütigen Substratreaktionsschritt erfolgt der Nachweis Festphase-gebundener Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe durch Umsetzung der farblosen Substratlösung mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Endprodukt. Diese Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag der blauen Lösung zu gelb auftritt. Die optische Dichte (OD) des Endprodukts bei 450 / ≥ 620 nm ist zur Konzentration des spezifisch gebundenen GDH-Antigens direkt proportional.

Testkomponenten

			Für 96 Kavitäten	Für 2x 96 Kavitäten
1	WELLS	Mikrotiterplatte beschichtet mit polyklonalen anti- <i>C.difficile</i> GDH -Antikörpern (Schaf)	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten Farbmarkierung grün vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2	WASHBUF CONC 10x	Waschpuffer 10-fach	100 ml Konzentrat für 1000 ml Lösung weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat für 2x 1000 ml Lösung weiße Kappe
3	DIL	Verdünnungsmedium	100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe	2x 100 ml · gebrauchsfertig gelb gefärbt schwarze Kappe
4	CONTROL +	Positive Kontrolle Rekombinante <i>C. difficile</i> GDH	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt rote Kappe
5	CONTROL -	Negative Kontrolle <i>C. difficile</i> GDH negative Probe	2,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe	4,0 ml · gebrauchsfertig blau gefärbt grüne Kappe
6	CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte, monoklonale anti- <i>C.difficile</i> GDH-Antikörper (Maus)	15 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe	25 ml · gebrauchsfertig grün gefärbt braune Kappe
7	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	15 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe	28 ml · gebrauchsfertig blaue Kappe
8	STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe	28 ml · gebrauchsfertig gelbe Kappe

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Gewinnung und Lagerung

Stuhlproben sollten sofort nach der Entnahme bei 2...8°C gelagert und innerhalb von 72 h untersucht oder bei mindestens -20°C gelagert werden. Wiederholtes (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben ist wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate zu vermeiden. Stuhlproben, die bereits im *Serazym*® Verdünnungsmedium entsprechend Testanleitung verdünnt wurden, können bis zu 72 Stunden bei 2...8 °C gelagert und anschließend im ELISA untersucht werden.

Vorbereitung und Verwendung

Stuhlproben gut durchmischen. In ein Reaktionsgefäß 1000 µl Verdünnungsmedium pipettieren. Bei festen oder halbfesten Stuhlproben 200 mg (Durchmesser etwa 4 - 6 mm) mit einem Einmalstäbchen, bei flüssigen Stuhlproben 200 µl in das Probenverdünnungsmedium überführen und sorgfältig mischen. Gegebenenfalls Schwebeteilchen durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge 1 min bei maximaler Drehzahl sedimentieren.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

Verstellbare Einkanal-Mikropipette · 8-Kanalpipette bzw. Multipipetten mit Pipettenspitzen · 8-Kanal-Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern oder Mikrotiterplatten-Waschgerät · Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 nm Mess- und ≥ 620 nm Referenzfilter · destilliertes oder deionisiertes Wasser · Messzylinder · Teströhrchen (2 ml) für die Probenverdünnung · Horizontalschüttler bei Abarbeitung nach Variante 2

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 96 oder 2x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8°C mindestens 2 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei 2...8°C mindestens 1 Monat verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Streifen ist in einem aluminium-beschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen. Waschpufferkonzentrat (10-fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel: 10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Testdurchführung

Der *Serazym*® Clostridium difficile GDH kann in zwei Varianten abgearbeitet werden:

1. Variante: Inkubation ohne Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 1 h 10 min
2. Variante: Inkubation mit Schütteln; Gesamtinkubationsdauer 40 min

Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 : 6 verdünnen, z.B. 200 mg oder 200 µl Stuhlprobe in 1,0 ml Verdünnungsmedium (3) gründlich resuspendieren.

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen!

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren!

Arbeitsschritte Variante 1 (ohne Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
3. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 60 min bei RT inkubieren.
5. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
7. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren.
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm / ≥620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Arbeitsschritte Variante 2 (mit Schütteln)

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. 3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** POD-Konjugat (6) pro Kavität.
3. Je 100 µl **CONTROL +** Positive Kontrolle (4)
100 µl **CONTROL -** Negative Kontrolle (5)
100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren und kurz schütteln.
4. Platte abkleben und 30 min bei RT auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von 500 – 700 / min inkubieren.
5. Dekantieren und 5 mal mit 300 µl Waschlösung (verdünnt aus (2)) waschen. Restflüssigkeit gegebenenfalls durch Ausschlagen auf Zellstoff entfernen.
6. 3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** Substrat (7) pro Kavität.
7. 10 min lichtgeschützt bei RT inkubieren (nicht schütteln).
8. 3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** Stopplösung (8) pro Kavität, kurz schütteln.
9. Messen der OD bei 450 nm / ≥ 620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Qualitative Evaluierung

Cut-off Bestimmung: OD Negative Kontrolle + 0,10

Proben mit OD-Werten gleich dem oder oberhalb des errechneten Grenzwertes sind als positiv, Proben mit OD-Werten unterhalb des errechneten Grenzwertes sind als negativ im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH zu bewerten.

Referenzwerte

<i>Serazym</i>[®] Clostridium difficile GDH	
Positiv	$\geq$ Cut-off
Negativ	$<$ Cut-off

Aufgrund von Unterschieden im Einsender-Klientel wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche bestimmen sollte. Die genannten Werte sind deshalb nur als Empfehlung zu werten.

Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- OD-Mittelwert der negativen Kontrolle $\leq 0,20$ (manuelle Abarbeitung)
 $\leq 0,30$ (automatische Abarbeitung)
- OD-Mittelwert der positiven Kontrolle $\geq 1,00$

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Grenzen der Methode

Der qualitative enzymimmunologische Nachweis von *Clostridium difficile* GDH in Stuhlproben ist nicht gleichbedeutend mit der Diagnose einer *C. difficile* assoziierten Erkrankung. *C. difficile* assoziierte Erkrankungen werden durch die Toxine A und B pathogener *C. difficile* Stämme verursacht. Bei positivem GDH-Nachweis muss daher zusätzlich auf die Toxine A und B getestet werden, um zu prüfen, ob es sich um einen toxischen Stamm handelt. Umgekehrt schließt ein negatives Testergebnis im GDH ELISA eine *C. difficile* Infektion nicht zwingend aus. Nach Herstellung der Probenverdünnung im Probenverdünnungspuffer sollte die Probe möglichst zügig (innerhalb von 72 Stunden) im ELISA getestet werden, da ein lagerungsbedingter Antigenabbau zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Mehrmaliges (> 3x) Einfrieren und Auftauen der Proben kann ebenfalls zum Antigenabbau und dadurch zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Bedingt durch die z.T. inhomogene Antigenverteilung in Stuhlproben kann bei ungenügender Homogenisierung der Proben ein falsch negatives Ergebnis resultieren. Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben können zu falschen Ergebnissen führen. Unkorrekte Verdünnung der Proben sowie nicht sedimentierte Festbestandteile in zentrifugierten Proben können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Die Gesamtinterpretation des ELISA-Testergebnisses sollte im Zusammenhang mit der Klinik erfolgen.

Automatische Abarbeitung

Bei Abarbeitung des *Serazym*® *Clostridium difficile* GDH auf einem Mikrotitrationsplatten-Vollautomaten (wie z.B. DS2, DSX) können in Abhängigkeit vom verwendeten Gerät und von den individuellen Geräteeinstellungen im Vergleich zur manuellen Bearbeitung höhere OD-Werte gemessen werden. In diesen Fällen ist die Erhöhung des max. zulässigen Grenzwertes für die OD der Negativ-Kontrolle auf 0,3 zulässig. Für den Waschprozess ist die Einprogrammierung von Waschpuffer-Einwirkzeiten (mind. 10 sec pro Streifen und Waschschrift) gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem oder demineralisiertem Wasser und 10 sec Einwirkzeit zu empfehlen. Gegebenenfalls kann die Anzahl der Waschschriffe von 5x auf 7x bis 8x erhöht werden.

Korrelation: manuelle – automatische Abarbeitung

Ein Probenkollektiv von 90 Stuhlproben (45 positive und 45 negative Proben) wurde parallel von Hand und automatisch (DS2, Dynex Technologies) abgearbeitet. Die Korrelation der OD-Werte beider Bearbeitungsvarianten betrug $r = 0,999$.

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay Variationskoeffizient (VK)
aus 8-fach Bestimmungen von
Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	2,800	0,040	1,52
2	1,960	0,045	2,46
3	0,611	0,041	7,19
4	0,352	0,017	5,15

Inter-Assay Variationskoeffizient (VK)
in 5 unterschiedlichen Ansätzen aus
Doppelbestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	1,707	0,250	14,6
2	1,155	0,148	12,8
3	0,895	0,098	10,9
4	0,381	0,068	17,9

Lot-zu-Lot-Reproduzierbarkeit
in drei verschiedenen Produktions-
chargen aus jeweils 8-fach
Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
1	1,840	0,166	9,0
2	1,285	0,172	13,4
3	0,349	0,093	26,6
4	0,026	0,005	17,6

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze von Glutamatdehydrogenase (GDH)-Antigen im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH wurde durch Titration von rekombinanter GDH mit 10 ng/ml bestimmt.

Spezifität und Sensitivität

Sensitivität im Vergleich zur PCR

Von 102 Stuhlproben, die mittels PCR als *Clostridium difficile* positiv bestimmt worden waren, reagierten 98 im *Serazym*[®] ELISA positiv, was einer Sensitivität von 96,1% entspricht.

Relative Sensitivität und Spezifität

Im Rahmen von 2 Vergleichsstudien wurden insgesamt 235 bzw. 170 Stuhlproben parallel im *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH und 2 weiteren kommerziell erhältlichen ELISAs untersucht.

Studie 1

n = 235	Vergleichs ELISA 1 positiv	Vergleichs ELISA 1 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	101	3**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	12*	119

Sensitivität: 89,4% · Spezifität: 97,5%

* 10 der 12 *Serazym*[®] ELISA negativ und Vergleichs ELISA 1 positiv getesteten Proben waren in 2 weiteren kommerziellen ELISAs negativ.

Sensitivität berichtigt: 98,1%

** Eine Probe wurde mittels PCR richtig positiv bestimmt.

Spezifität berichtigt: 98,3%

Studie 2

n = 170	Vergleichs ELISA 2 positiv	Vergleichs ELISA 2 negativ
<i>Serazym</i> [®] ELISA positiv	69	1*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negativ	3	97

Sensitivität: 95,8% · Spezifität: 98,9%

* Diese Probe wurde mittels PCR richtig positiv bestimmt.

Spezifität berichtigt: 100%

Kreuzreaktivität

Negative Stuhlsuspensionen wurden mit folgenden Mikroorganismen mit einer Keimzahl von $\geq 10^8$ Kolonie bildenden Einheiten pro ml aufgestockt und im *Serazym*[®] ELISA negativ getestet (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Seroovar <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Seroovar <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Vibrio cholerae</i>	Klinisches Isolat
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp 03, 09	Klinische Isolate

Interferenz

Die nachfolgend aufgelisteten Substanzen zeigten bei Zumischung zu positiven und negativen Stuhlproben in den angegebenen Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis: Bariumsulfat (5%), Buscopan® (2 mg/ml), Cyclamat (5%), Diclofenac (2 mg/ml), Hämoglobin (5 mg/ml), Hylak® N (5%), Immodium® akut duo (0,2/12,5 mg/ml), Iberogast® (5%), Loperamid (0,2 mg/ml), Metronidazol (2 mg/ml), Mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), Palmitinsäure (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2,5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simagel® (2 mg/ml), Stearinsäure (20%), Vancomycinhydrochlorid (0,5%).

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro* Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Mikrotiterplatten und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.**

Das Verdünnungsmedium, der Waschpuffer, die TMB/Substratlösung und Stopplösung kann darüber hinaus Parameter-übergreifend für die *Serazym*® Stuhlteste Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) und Giardia (E-106) eingesetzt werden.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8°C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

Nicht essen, trinken oder rauchen!

Nie mit dem Mund pipettieren!

Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!

Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2021-02-02	Vorbereitung und Lagerung der Proben, Testdurchführung	Aktualisierung

Inkubationsschema *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH (E-107)

1.  3 Tropfen (oder 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **verdünnte Stuhlprobe** pipettieren, kurz schütteln
 60 min Inkubation (Raumtemperatur)
alternativ: 30 min unter Schütteln
 5x Waschen mit Waschlösung
2.  3 Tropfen (oder 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min Inkubation (Raumtemperatur), lichtgeschützt
3.  3 Tropfen (oder 100 µl) **STOP** (8)

Messung der OD bei 450 / $\geq$ 620 nm



Hersteller



Herstellungsdatum



Verwendbar bis



Charge



Artikelnummer



Vor Sonnenlicht schützen



Temperaturbegrenzung



Biologische Risiken



Nicht wiederverwendbar



Gebrauchsanweisung beachten



Achtung



In-vitro- Diagnostikum



Ausreichend für <n> Prüfungen

Serazym[®] Clostridium difficile GDH

Enzyme immunoassay for detection of *Clostridium difficile* GDH in faecal specimens

REF E-107  96 REF E-107-A2  2x 96 IVD *In-vitro*-diagnostic medical device 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

The spore forming anaerobic bacterium *Clostridium difficile* is the most common cause of nosocomial diarrheas predominantly developing in the course of antibiotic therapy. The severity of the disease in dependence of the health status of the patient but also of the pathogenicity of the *C. difficile* strain may range from bloody diarrhea to Colitis and pseudomembranous Colitis up to toxic megacolon. The two exotoxins A and B are responsible for the development of the symptoms. Most *Clostridium difficile* strains produce both, toxin A and B, but some are characterized by isolated toxin B production. Atoxigenic strains are generally considered as nonpathogenic and therefore diagnostically irrelevant. The *Clostridium difficile* specific enzyme Glutamatdehydrogenase, also described as “common antigen” is produced by both: toxigenic and atoxigenic strains.

The human intestine is colonized with *Clostridium difficile* in 2 - 3% of healthy adults and in up to 50% of children < 2 years of age. Therefore, the diagnosis of a *Clostridium difficile* associated diarrhea (CDAD) has to be confirmed by the detection of the toxins A and B.

Changes in the epidemiological situation are observed since several years: Increasingly also young adults and not hospitalized patients get sick developing the symptoms of CDAD. An increasing number of severe developments of the disease caused by highly virulent strains also occur. In this context testing of patient's status as carrier seems reasonable.

Different approaches have developed in laboratory diagnosis of *C. difficile* infections. Usually direct toxin A and B detection from stool or enrichment cultures is performed by enzyme immunoassay. In addition, a new two-step procedure has been established in several laboratories that comprise a first screening of *C. difficile* GDH and the subsequent testing for toxins A and B of GDH positive samples. The isolated detection of GDH is neither sufficient for diagnosing a CDAD nor suitable for a therapeutic decision, but always needs to be completed by the testing for toxins A and B.

References:

1. Wilkins TD and Lysterly DM (2003): „Clostridium difficile Testing: after 20 Years, Still Challenging“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 41, No.2, p531-534
2. Von Eichel-Streiber C und Braun V (2008): “Das difficile Clostridium” Journal Of Laboratory Medicine, Vol. 32, No. 4, p219-234
3. Lysterly DM, Barroso LA, Wilkins TD (1991): “Identification of the latex test-reactive protein of Clostridium difficile as glutamate dehydrogenase.” Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 29, p2639-2642.
4. Zhen L, Keller SF, Lysterly DM et al. (2004): „Multicenter Evaluation of a New Screening Test That Detects Clostridium difficile in Faecal Specimens“ Journal Of Clinical Microbiology, Vol. 42, No. 8, p3837-3840.
5. Peterson LR and Robicsek A (2009): “Does My Patient Have Clostridium difficile Infection?” Annals of Internal Medicine, Vol. 151, No. 3, p176-180.

Intended Use

Serazym® Clostridium difficile GDH is an *in-vitro* diagnostic medical device for direct detection of Glutamatdehydrogenase (GDH) of *Clostridium difficile* in faecal specimens.

Principle of the Test

Serazym® Clostridium difficile GDH is a one-step enzyme immunoassay on the basis of polyclonal and monoclonal antibodies to Glutamatdehydrogenase (GDH) of *Clostridium difficile*. Diluted stool specimens and monoclonal anti-GDH antibodies are dispensed simultaneously into the wells of a microtitration plate coated with polyclonal anti-GDH antibodies. After an incubation time of 60 min at room temperature (RT) unbound components are removed by a washing step. Alternatively, the first incubation can be shortened to 30 min by shaking. HRP converts the subsequently added colourless substrate solution of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) within a 10 min reaction time into a blue product. The enzyme reaction is terminated by sulphuric acid dispensed into the wells turning the solution from blue to yellow. The optical density (OD) of the solution read at 450 / $\geq$ 620 nm is directly proportional to the specifically bound amount of GDH antigen in the respective sample. Considering the cut-off value results are interpreted as positive or negative.

Test Components

			For 96 Wells	For 2x 96 Wells
1	WELLS	Microtitration plate coated with polyclonal anti- <i>C.difficile</i> GDH antibodies (sheep)	12 single breakable 8-well strips colour coding green vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips colour coding green vacuum-sealed with desiccant
2	WASHBUF CONC 10x	Wash buffer 10-fold	100 ml concentrate for 1000 ml solution white cap	2x 100 ml concentrate for 2x 1000 ml solution white cap
3	DIL	Sample diluent	100 ml · ready to use coloured yellow black cap	2x 100 ml · ready to use coloured yellow black cap
4	CONTROL +	Positive control Recombinant <i>C. difficile</i> GDH	2.0 ml · ready to use coloured blue red cap	4.0 ml · ready to use coloured blue red cap
5	CONTROL -	Negative control <i>C. difficile</i> GDH negative sample	2.0 ml · ready to use coloured blue green cap	4.0 ml · ready to use coloured blue green cap
6	CONJ HRP	HRP-conjugate HRP-labelled, monoclonal anti- <i>C.difficile</i> GDH antibodies (mouse)	15 ml · ready to use coloured green brown cap	25 ml · ready to use coloured green brown cap
7	SUBSTR TMB	Substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	15 ml · ready to use blue cap	28 ml · ready to use blue cap
8	STOP	Stop solution 0.25 M sulphuric acid	15 ml · ready to use yellow cap	28 ml · ready to use yellow cap

Preparation and Storage of Samples

Collection and storage

Stool samples should be stored at 2...8°C immediately after collection and processed within 72 hours. Longer storage is possible at least at -20°C. Repeated (> 3x) freezing and thawing of samples should be avoided. Stool samples already diluted with the *Serazym*[®] sample diluent can be stored for up to 72 h at 2...8 °C before testing in the ELISA.

Preparation

Mix samples thoroughly. Pipette 1000 µl of sample diluent into a clean tube. Using a disposable stirring rod transfer about 200 mg (diameter about 4 - 6 mm) of faeces if solid or pipette 200 µl if liquid into the tube and suspend thoroughly. Spin down floating particles in a micro centrifuge at maximum speed for 1 min if necessary.

Materials required but not provided

Micropipettes · multi-channel pipette or multi-pipette · Reagent container for multi-channel pipette · 8-channel wash comb with vacuum pump and waste bottle or microplate washer or 8-channel pipette · microplate reader with optical filters for 450 nm for measurement and ≥ 620 nm for reference · distilled or deionized water · glassware · tubes (2 ml) for sample preparation · orbital shaker for performance of test variant 2

Preparation and Storage of Reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1 x 96 or 2 x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label, that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8°C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 2 months, provided proper storage. The ready to use wash solution can be used for at least one month when stored at 2...8°C.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed.

Prepare a sufficient amount of wash solution by diluting the 10-fold concentrated wash buffer 1 + 9 with distilled or deionized water.

For Example: 10 ml wash buffer concentrate (2) + 90 ml distilled or deionized water.

Assay Procedure

The *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH can be performed in two ways:

1. Incubation without shaking; complete test duration 1 h and 10 minutes
2. Incubation with shaking; complete test duration 40 minutes

Dilute samples with sample diluent (3) 1 : 6 e.g. 200 mg or 200 µl stool + 1.0 ml sample diluent (3) and mix thoroughly.

Avoid any time shift during dispensing of reagents and samples.

Make sure the soak time of the wash buffer in the wells is at least 5 seconds per wash cycle and that residual fluid is completely drained in every single wash cycle!

Avoid direct light exposure of the TMB substrate solution!

Working steps variant 1: without shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted sample**, mix gently
4. Cover plate and incubate for 60 min at RT.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. Dispense 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at RT protected from light.
8. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Working steps variant 2: with shaking

1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Dispense 3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** HRP-conjugate (6) per well and
3. Pipette: 100 µl **CONTROL +** positive control (4)
100 µl **CONTROL -** negative control (5)
100 µl **diluted sample**, mix gently
4. Cover plate and incubate for 30 min at RT on an orbital shaker with a frequency of 500 – 700 / min.
5. Decant, then wash each well 5x with 300 µl wash solution (diluted from (2)) and tap dry onto absorbent paper if necessary.
6. Dispense 3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** substrate (7) per well.
7. Incubate for 10 min at RT protected from light.
8. Dispense 3 drops (or 100 µl) **STOP** stop solution (8) per well, mix gently.
9. Read OD at 450 nm / ≥ 620 nm with a microplate reader within 30 min after reaction stop.

Result Interpretation

Qualitative evaluation

Cut-off determination: OD negative control + 0.10

Samples with OD values equal to or higher than the cut-off value are considered positive, samples with OD values below the cut-off value are considered negative in the *Serazym*® C. difficile GDH.

Reference Values

<i>Serazym</i>® Clostridium difficile GDH	
Positive	$\geq$ Cut-off
Negative	$<$ Cut-off

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological reference ranges as usually done for other diagnostic parameters too. Therefore, the mentioned reference values provide a guide only to values which might be expected.

Test validity

The test run is valid if:

- the mean OD of the negative control is ≤ 0.20 (manual performance)
 ≤ 0.30 (automatic performance)
- the mean OD of the positive control is ≥ 1.00

If the above mentioned quality criteria are not met, repeat the test and make sure that the test procedure is followed correctly (incubation times and temperatures, sample and wash buffer dilution, wash steps etc.). In case of repeated failure of the quality criteria contact your supplier.

Limitations of the procedure

The qualitative determination of *Clostridium difficile* GDH in stool specimens by enzyme immunoassay is not equivalent to the diagnosis of a *C. difficile* associated disease (CDAD). CDADs are caused by the toxins A and B of pathogenic *C. difficile* strains. Therefore, a positive GDH test result has to be supplemented by testing for toxins A and B, in order to confirm or exclude a toxigenic strain. On the other hand a negative GDH test result does not necessarily exclude a *C. difficile* infection. After dilution in sample diluent the samples should be tested by ELISA as quickly as possible, at least within 72 hours, because storage-depending antigen degradation may cause false negative results. More than 3 freeze-thaw cycles may also cause false negative results due to antigen degradation. As a result of inhomogeneous antigen distribution in some stool samples insufficient homogenizing may also cause false negative results. Cross contamination of reagents and samples can produce false positive results. Incorrect dilutions or solid particles after centrifugation of the suspension can cause false negative as well as false positive results. The overall interpretation of the ELISA results should always consider the microbiological examination as well as clinical findings.

Automatic Processing

Performing the *Serazym*[®] *Clostridium difficile* GDH on fully automated microplate processors (e.g. DS2 or DSX) may cause elevated absorbances in comparison to the manual procedure due to individual differences concerning wash procedures and general technical specifications of the equipment. In these cases a maximum value of 0.3 absorbance units is permissible for the negative control. It is recommended to use a wash procedure including 10 seconds soak time per strip and wash step followed by a wash step with distilled or deionized water with 10 seconds of soak time after the final wash step of each wash cycle. If necessary the number of washing steps can be enhanced from 5x to 7x - 8x.

Correlation: manual – automatic processing

A panel of 90 stool specimens (45 positive and 45 negative samples) was investigated in parallel by manual and automatic processing method (DS2, Dynex Technologies) resp. The correlation was calculated with $r = 0.999$.

Performance Characteristics

Precision

Intra-assay coefficient of variation (CV) calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	2.800	0.040	1.52
2	1.960	0.045	2.46
3	0.611	0.041	7.19
4	0.352	0.017	5.15

Inter-assay coefficient of variation (CV) in 5 different test runs calculated from twofold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.707	0.250	14.6
2	1.155	0.148	12.8
3	0.895	0.098	10.9
4	0.381	0.068	17.9

Lot-to-Lot reproducibility in 3 different production lots calculated from 8-fold determinations of samples:

sample	mean OD	standard deviation	CV (%)
1	1.840	0.166	9.0
2	1.285	0.172	13.4
3	0.349	0.093	26.6
4	0.026	0.005	17.6

Lower detection limit

The lower detection limit of Glutamatdehydrogenase (GDH) in the *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH was determined 10 ng/ml by titration of recombinant GDH antigen.

Sensitivity and specificity

Sensitivity in comparison to PCR

Ninety eight out of 102 stool specimens characterized *Clostridium difficile* positive by PCR were tested positive with the *Serazym*[®] ELISA corresponding to a sensitivity of 96.1%.

Comparative sensitivity and specificity

In two comparative studies 235 and 170 stool samples were tested in parallel in the *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH and 2 other commercially available ELISAs respectively.

Study 1

n = 235	comparative ELISA 1 positive	comparative ELISA 1 negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	101	3**
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	12*	119

Sensitivity: 89.4% · Specificity: 97.5%

* 10 out of 12 *Serazym*[®] ELISA negative and comparative ELISA 1 positive samples were tested negative in 2 other commercial ELISAs. Sensitivity amended: 98.1%

** One sample was confirmed true positive by PCR. Specificity amended: 98.3%

Study 2

n = 170	comparative ELISA 2 positive	comparative ELISA 2 negative
<i>Serazym</i> [®] ELISA positive	69	1*
<i>Serazym</i> [®] ELISA negative	3	97

Sensitivity: 95.8% · Specificity: 98.9%

* This sample was confirmed true positive by PCR.

Specificity amended: 100%

Cross reactivity

Negative stool specimens have been spiked with $\geq 10^8$ colony forming units of the following microorganisms and tested negative with the *Serazym*[®] ELISA (OD 450 / 620 nm < Cut-Off):

<i>Aeromonas hydrophila</i>	(ATCC 7966)
<i>Bacillus cereus</i>	(ATCC 11778)
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)
<i>Bacteroides fragilis</i>	(ATCC 25285)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Campylobacter coli</i>	(ATCC 33559)
<i>Campylobacter jejuni</i>	(ATCC 33291)
<i>Citrobacter freundii</i>	(ATCC 8090)
<i>Clostridium sordellii</i>	(ATCC 9714)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(ATCC 13048)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(ATCC 13047)
<i>Enterococcus faecalis</i>	(ATCC 29212)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(ATCC 13883)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	(ATCC 27337)
<i>Proteus vulgaris</i>	(ATCC 8427)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 10145)
<i>Salmonella enterica</i> Sero var <i>enteritidis</i>	(ATCC 13076)
<i>Salmonella enterica</i> Sero var <i>typhimurium</i>	(ATCC 14028)
<i>Shigella flexneri</i>	(ATCC 12022)
<i>Shigella sonnei</i>	(ATCC 25931)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	(ATCC 12228)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	(ATCC 17802)
<i>Vibrio cholerae</i>	Clinical isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i> Serotyp <i>O3, O9</i>	Clinical isolates

Interference

None of the following substances added to GDH positive and negative stool samples showed a significant impact on the test result:

barium sulphate (5%), Buscopan® (2 mg/ml), cyclamate (5%), Diclofenac (2 mg/ml), haemoglobine (5 mg/ml), Hylak® N (5%), Immodium® akut duo (0.2/12.5 mg/ml), Iberogast® (5%), loperamide (0.2 mg/ml), metronidazole (2 mg/ml), mucin (5 mg/ml), Nexium® (2 mg/ml), palmitic acid (20%), Pentofuryl® (2 mg/ml), Pepto-Bismol (1 mg/ml), Perenterol (2.5 mg/ml), Rennie® (8 mg/ml), Simagel® (2 mg/ml), stearic acid (20%), vancomycin hydrochloride (0.5%).

Common Advices and Precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instructions carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. Do not use reagents from damaged packages or bottles. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. **Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution.**

The sample diluent, wash buffer, TMB/substrate solution and stop solution is universally applicable for the *Serazym*® stool ELISA Adenovirus (E-017), Rotavirus (E-020), Astrovirus (E-045), Norovirus (E-061), Clostridium difficile Toxin A+B (E-040), Clostridium difficile GDH (E-107), Campylobacter (E-093), H. pylori 2nd Gen. (E-114), Entamoeba histolytica (E-018), Cryptosporidium parvum (E-039), Giardia lamblia (E-038) and Giardia (E-106).

Do not use reagents from other manufacturers. Avoid time shift during dispensing of reagents. All reagents should be kept at 2...8°C before use. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous. Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should generally be observed:

Do not smoke, eat or drink while handling kit material!

Always use protective gloves!

Never pipette material by mouth!

Note safety precautions of the single test components!



History of Changes

Version	Section	Modifications
2021-02-02	Preparation And Storage Of Samples, Assay Procedure	Update

Incubation Scheme *Serazym*[®] Clostridium difficile GDH (E-107)

1.  3 drops (or 100 µl) **CONJ HRP** (6)
 +
 pipette
 100 µl **CONTROL +** (4)
 100 µl **CONTROL -** (5)
 100 µl **stool sample**, mix gently
 60 min incubation (room temperature)
alternatively 30 min while shaking
 5x wash with wash solution
2.  3 drops (or 100 µl) **SUBSTR TMB** (7)
 10 min incubation protected from light (room temperature)
without shaking
3.  3 drops (or 100 µl) **STOP** (8)
Read OD at 450 / ≥ 620 nm



Manufacturer



Date of manufacture



Use by



Batch code



Catalog number



Keep away from sunlight



Temperature limits



Biological risks



Do not reuse



Consult instructions for use



Caution



In-vitro-diagnostic medical device



Contains sufficient for <n> tests

NovaLisa®

Clostridium tetani toxin IgG

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

English	2
Deutsch	8
Français	14
Italiano	20
Español	26
Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografía / Bibliografia	32
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	32
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	36

Product Number: TETG0430 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Clostridia are spore-forming gram-positive bacteria. The round spores are build at the terminal end which results in the microscope in a "tennis racket" like shape.

Tetanus develops only when spores of *Clostridium tetani* germinate under strict anaerobic conditions after gaining access to wounds and small lacerations. The clinical manifestation of the disease is primary not caused by the invasion of the exciter but by the secretion of a powerful neurotoxin (tetanospasmin). This toxin blocks the inhibition of the signal transduction and has a high affinity to the central nervous system. The consequence is hyper excitability of the muscles to external stimuli in combination with a principal increase of the muscle tonus without influence of consciousness. It starts with tonic spasm of muscles (trismus), mimic muscles and gallet muscles. Neck, back and abdominal musculature follow. At the same time the appearance of reactory spasm of whole muscle groups can hamper breathing. Hyper salivation and swallowing problems cause aspiration and pneumonia with the next breath.

Clostridium tetani is ubiquitous present in soil and intestine of humans and animals. Ingestion of bacteria or growth in the intestine of man or animal is without harm. The spores are extremely resistant towards heat and can stay infectious for a long period. The bacteria can get under the skin by even smallest wounds. In Europe tetanus mainly occurs after injuries and sometimes postoperative whereas in developing countries Tetanus is widely disseminated. The WHO assumes that one million people die because of tetanus worldwide per year.

Tetanus toxin is an excellent immunogen in man - only one antigenic type of toxin. The only effective way to control tetanus is by prophylactic active immunization.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus	Trismus, dysphagia, severe, painful spasms of whole muscle groups, hypersalivation, aspiration, asphyxia	Injury (Infection of the wound with <i>Clostridium tetani</i>)

The presence of pathogen or infection may be identified by

- Microscopy
- Serology: e.g. ELISA

2. INTENDED USE

The *Clostridium tetani* toxin IgG ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against *Clostridium tetani* 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

- **Clostridium tetani toxin Coated Microplate (IgG):** 12 break apart 8-well snap-off strips coated with Clostridium tetani 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.
- **Clostridium tetani 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.
- **Clostridium tetani toxin IgG Standards:** 4 vials, each containing 2 ml standard (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use.

Standard A:	0.0	IU/ml; blue cap
Standard B:	0.1	IU/ml; green cap
Standard C:	0.5	IU/ml; yellow cap
Standard D:	1.0	IU/ml; red cap

The standards are calibrated in accordance with the Who International Standard; "1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human"; NIBSC Code: TE-3.

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 Clostridium tetani 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:

- **Substrat-Blank:** Absorbance value < 0.100
- **Standard A:** Absorbance value < 0.200
- **Standard B:** Absorbance value > 0.150
- **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.

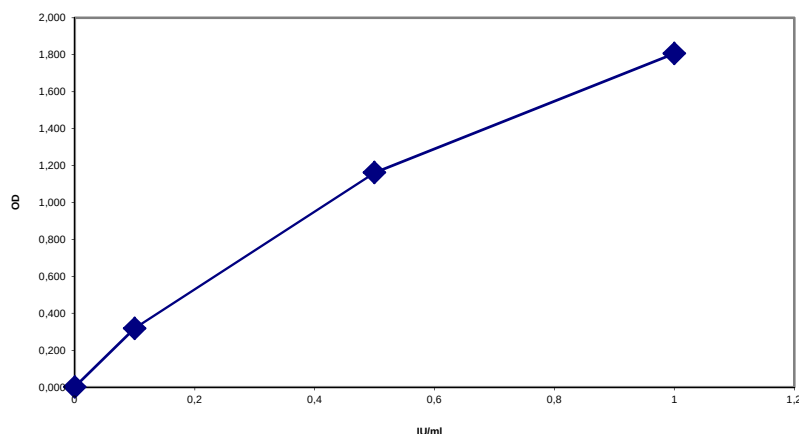
9.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in IU/ml** plot the (mean) absorbance values of the 4 Standards A - D on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0.0 / 0.1 / 0.5 and 1.0 IU/ml) and draw a standard curve (absorbance values on the y-axis, concentrations on the x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each 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 and Recommendations [IU/ml]

< 0.1 IU/ml	No protective antibody level or no reliable protection! Immediate full course of basic immunization or booster injection and control of antibody concentration 4 to 6 weeks later is recommended.
0.11 - 0.5 IU/ml	Reliable protection! Booster injection and control of antibody concentration 4 to 6 weeks later is recommended.
0.51 - 1.0 IU/ml	Reliable protection; control of antibody concentration after about 2 years is recommended. Booster injection is not required. Note: In cases of antibody concentrations greater than 0.5 IU/ml vaccination can cause side effects!
1.1 - 5.0 IU/ml	Range of long term protection: Control after 5 to 10 years
> 5.0 IU/ml	Range of long term protection: Control after 10 years 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 (E)	Cv (%)
#1	24	1.306	3.60
#2	24	1.805	3.46
#3	24	1.591	5.34
Interassay	n	Mean (IU/ml)	Cv (%)
#1	12	0.060	9.62
#2	12	0.084	11.33
#3	12	0.658	13.99

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: 76.84% - 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 99.22% (95% confidence interval: 95.76% - 99.98%).

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 0.01 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 0.01 IU/ml – 1 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.: TETG0430 Clostridium tetani toxin IgG ELISA (96 Determinations)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Clostridium tetani ist ein grampositives Stäbchenbakterium, das terminal runde Sporen ausbilden kann, so dass sich im mikroskopischen Bild die Form eines Trommelschlegels ergibt.

Clostridium tetani ist der Erreger des Tetanus (Wundstarrkrampf). Tetanus entsteht, wenn Tetanussporen in die Tiefe einer Wunde gelangen, dort unter anaeroben Bedingungen auskeimen und ihre Toxine absondern. Die klinische Manifestation der Erkrankung ist dabei primär nicht durch das invasive Verhalten der Erreger bedingt, sondern durch das sezernieren eines starken Neurotoxins (Tetanospasmin). Dieses Toxin blockiert die Hemmung der Reizweiterleitung und hat eine besonders hohe Affinität zum Zentralnervensystem. Die Folge ist eine Übererregbarkeit der Muskulatur auf äußere Reize bei einer prinzipiellen Erhöhung des Muskeltonus ohne Beeinträchtigung des Bewusstseins. Tonischer Krampf der Muskulatur (Trismus), der mimischen Muskulatur und der Schlundmuskeln stehen am Anfang. Hals-, Rücken- und Bauchmuskeln folgen. Gleichzeitig reflektorisch auftretende Spasmen ganzer Muskelgruppen können Atembewegungen unmöglich machen. Hypersalivation und Schluckstörung verursachen beim anschließenden Atemholen Aspiration und Pneumonie.

Clostridium tetani kommt weltweit in der Darmflora von Mensch und Tier, vor allem aber in Staub und Erde vor. Die Sporen sind sehr widerstandsfähig gegen Hitze und können über lange Zeit infektiös bleiben. Bei Verletzungen, auch der kleinsten, können Erreger unter die Haut gebracht werden. Hauptsächlich in warmen, tropischen Gegenden kommt Tetanus gehäuft vor, in Mitteleuropa ist das Krankheitsbild durch höheren medizinischen Standard selten. Insgesamt wird von der WHO angenommen, dass pro Jahr weltweit eine Million Menschen an Tetanus versterben.

Tetanustoxin ist für den Menschen ein exzellentes Immunogen. Es handelt sich nur um einen antigenen Typ des Toxins. Die einzige effektive Kontrolle von Tetanus besteht in der prophylaktischen, aktiven Immunisierung.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus	Trismus, Dysphagie, schwere, schmerzhafte Spasmen ganzer Muskelgruppen, Hypersalivation, Aspiration, Asphyxie	Verletzung (Wundinfektion mit <i>Clostridium tetani</i>)

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie
- Nachweis. z.B. ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

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

3. TESTPRINZIP

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

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines 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

- **Clostridium tetani toxin beschichtete Mikrotiterplatte (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Clostridium tetani 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.
- **Clostridium tetani 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.
- **Clostridium tetani toxin IgG Standards:** 4 Fläschchen mit 2 ml Standardlösung (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; gebrauchsfertig.
Standard A: 0,0 IU/ml; blaue Verschlusskappe
Standard B: 0,1 IU/ml; grüne Verschlusskappe
Standard C: 0,5 IU/ml; gelbe Verschlusskappe
Standard D: 1,0 IU/ml; rote Verschlusskappe
Die Standards sind am Who International Standard; "1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human" kalibriert; NIBSC Code: TE-3.

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 Clostridium tetani 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 > 0,150
- **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.

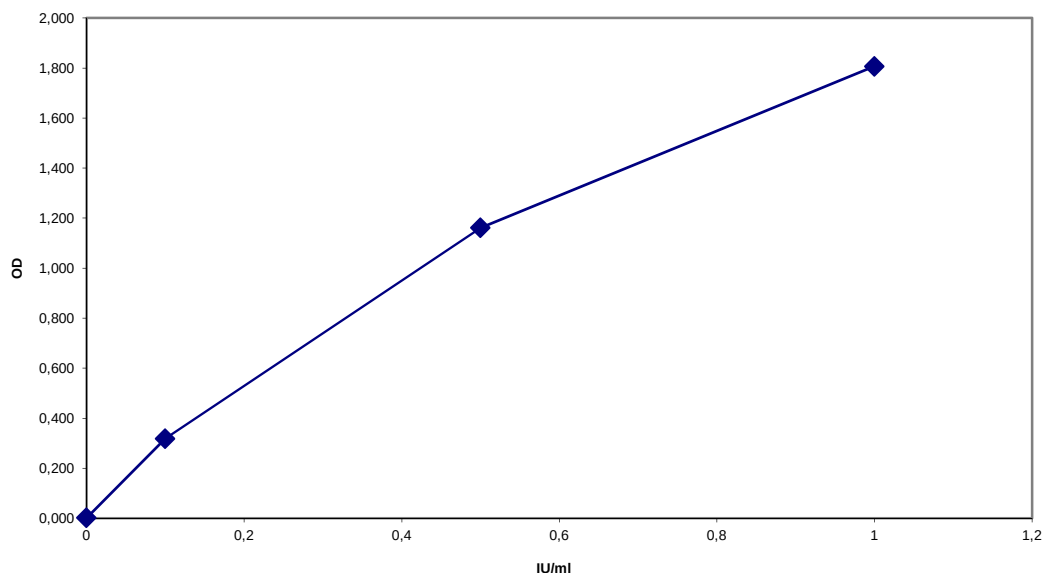
9.2. Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse in **IU/ml** zu erhalten, die Extinktionswerte der vier Standards A, B, C, und D gegen ihre entsprechende Konzentration (0 / 0,1 / 0,5 und 1,0 IU/ml) auftragen und eine Standardkurve erstellen (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 und Empfehlungen [IU/ml]

< 0,1 IU/ml	Kein Antikörperspiegel oder kein verlässlicher Schutz vor Infektion! Grundimmunisierung oder Auffrisch-Impfung und Kontrolle des Antikörperspiegels nach 4-6 Wochen empfohlen.
0,11 - 0,5 IU/ml	Verlässlicher Schutz vor Infektion! Auffrisch-Impfung und Kontrolle der Antikörperspiegel nach 4-6 Wochen empfohlen.
0,51 - 1,0 IU/ml	Verlässlicher Schutz vor Infektion! Antikörperspiegel nach 2 Jahren erneut kontrollieren, Auffrisch-Impfung nicht erforderlich. Hinweis: Auffrisch-Impfungen bei einer Antikörperkonzentration > 0,5 IU/ml können zu Nebenwirkungen führen.
1,1 - 5,0 IU/ml	Bereich des Langzeit-Schutzes! Kontrolle nach 5 - 10 Jahren.
> 5,0 IU/ml	Bereich des Langzeit-Schutzes! Kontrolle nach 10 Jahren empfohlen.

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	1,306	3,60
#2	24	1,805	3,46
#3	24	1,591	5,34
Interassay	n	Mittelwert (IU/ml)	Vk (%)
#1	12	0,060	9,62
#2	12	0,084	11,33
#3	12	0,658	13,99

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 ist 100,0% (95% Konfidenzintervall: 76,84% - 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 99,22% (95% Konfidenzintervall: 95,76% - 99,98%).

10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Tests (gemäß CLSI EP17-A) ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie ist 0,01 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 0,01 IU/ml – 1,0 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: TETG0430 Clostridium tetani toxin IgG ELISA (96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

Clostridium tetani est une bactérie sporulée, anaérobie et Gram-positive. Sa pathogénicité dépend de la libération d'enzymes fortement destructifs ou d'exotoxines puissantes. *Clostridium tetani* est ubiquitaire dans le sol et dans les excréments de divers animaux. La bactérie produit (entre autres) la tétanospasmine, une neurotoxine puissante, qui est libérée par autolyse. Par conséquent, le tétanos développe des syndromes seulement si les spores de *Clostridium tetani* germent dans des conditions strictement anaérobies après avoir accédé par des blessures et des petites ulcérations. L'ingestion des bactéries et la croissance bactérienne dans l'intestin de l'homme ou de l'animal sont inoffensives. La tétanospasmine est un agent extrêmement toxique qui cause toujours la mort dans 50% des patients infectés. En Europe, le tétanos se produit surtout après des blessures et parfois après des opérations, tandis que dans les pays en voie de développement *Tetanus neonatorum* est largement disséminé et cause la mort jusque chez 10% des nouveaux-nés.

La toxine de tétanos est un excellent immunogène chez l'homme (un seul type antigénique de la toxine). La seule manière efficace de contrôler le tétanos est par l'immunisation prophylactique active avec l'anatoxine traitée au formaldéhyde.

Espèce	La maladie	Symptômes (p.ex.)	Modes de transmission
<i>Clostridium tetani</i>	Tétanos	Trismus, dysphagie, Spasmes graves et douloureux des groupes musculaires entiers, hypersalivation, aspiration, l'asphyxie	Lésions (Contact d'une plaie avec <i>Clostridium tetani</i>)

La présence des bactéries peut être identifiée par:

- Microscopie
- Sérologie: p.ex. ELISA

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse *Clostridium tetani* toxin IgG ELISA est prévue pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-*Clostridium tetani* 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

- **Clostridium tetani toxin IgG microplaque revêtus:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'*Clostridium tetani* toxine (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 Clostridium tetani toxin anti-IgG:** 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps IgG anti-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; < 5% NMP.
- **Étalons à Clostridium tetani toxin IgG:** 4 flacons contenant chacun 2 ml étalon (sérum humain ou plasma); de couleur jaune ; prêt à l'emploi.

Etalon A: 0,0 IU/ml; bouchon bleu

Etalon B: 0,1 IU/ml; bouchon vert

Etalon C: 0,5 IU/ml; bouchon jaune

Etalon D: 1,0 IU/ml; bouchon rouge

Les étalons sont calibrés conformément au, Who International Standard; "1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human"; NIBSC Code: TE-3.

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

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollant
- 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 *Clostridium tetani* toxine (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 humains 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 I 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**
- **Etalon A:** Valeur d'absorbance < **0,200**
- **Etalon B:** Valeur d'absorbance > **0,150**
- **Etalon C:** Valeur d'absorbance > **0,500**
- **Etalon D:** Valeur d'absorbance > **1,000**

Etalon A < Etalon B < Etalon C < Etalon D

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

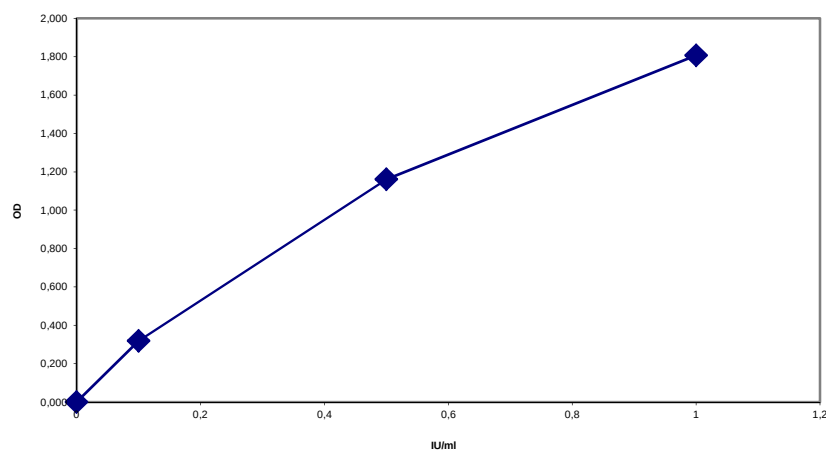
9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats quantitatifs en **IU/ml**, utiliser du papier millimétré bilinéaire. Incrire les valeurs (moyennes) d'absorbance des 4 étalons A, B, C et D en ordonnées et leurs concentrations correspondantes (0,0/ 0,1/ 0,5 et 1,0 IU/ml) en abscisses, et dessiner une courbe d'étalonnage.

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

Pour le calcul de la courbe d'étalonnage le mathématique fonction point à point peuvent être employées.

9.3. Courbe d'étalonnage type



9.4. Interprétation des résultats et recommandations [IU/ml]

< 0,1 IU/ml	Aucun niveau protecteur d'anticorps ou aucune protection fiable! l'administration complète et immédiate de l'immunisation de base ou une injection de rappel et le contrôle de la concentration d'anticorps après 4 à 6 semaines sont recommandés
0,11 – 0,5 IU/ml	protection fiable ! une injection de rappel et le contrôle de la concentration d'anticorps après 4 à 6 semaines sont recommandés
0,51 – 1,0 IU/ml	protection fiable ! un contrôle de la concentration d'anticorps après environ 2 ans est recommandé. Booster n'est pas exigé. Note: Dans les cas des concentrations d'anticorps plus élevées que 0,5 IU/ml, la vaccination peut causer des effets secondaires!
1,1 -5,0 IU/ml	protection à long terme: Contrôle après 5 à 10 ans
> 5,0 IU/ml	protection à long terme: Contrôle après 10 ans.

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

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	1,306	3,60
#2	24	1,805	3,46
#3	24	1,591	5,34
Inter-essai	n	moyenne (IU/ml)	CV (%)
#1	12	0,060	9,62
#2	12	0,084	11,33
#3	12	0,658	13,99

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: 76,84% - 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 99,22% (95% Intervalle de confiance: 95,76% - 99,98%).

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 zero est 0,01 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 0,01 IU/ml – 1,0 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: TETG0430 Clostridium tetani toxin IgG ELISA (96 déterminations)

ITALIANO

1. INTRODUZIONE

Clostridium tetani é un batterio a bastoncello, mobile, Gram-positivo e anaerobico. Le spore si trovano generalmente nel terreno e nella polvere. Sono molto resistenti al calore e rimangono contagiose per molto tempo. Il *C. tetani* vive da commensale innocuo nell'intestino di uomini e animali, ma se viene a contatto con una ferita causa il tetano. I batteri proliferano e producono una tossina che irrita i nervi causando delle contrazioni muscolari spastiche. Dopo 4-25 giorni di incubazione si manifestano i primi sintomi: l'indurimento dei muscoli e spasmi localizzati dapprima alla regione mandibolare e occipitale e quindi del torace, degli arti e dell'addome. Questi sintomi in genere vengono accompagnati da febbre elevata, convulsioni e dolori violenti. Nei casi più gravi sono coinvolti anche i muscoli dell'apparato respiratorio. In assenza di una terapia appropriata si registra un tasso di mortalità elevato. Il tetano è presente soprattutto nei paesi caldi e tropicali mentre in Europa si registra raramente un quadro clinico completo. La vaccinazione è efficace, ma ha una validità limitata nel tempo.

Specie	Malattia	Sintomi (p.es.)	Via di trasmissione
<i>Clostridium tetani</i>	Tetano	Trisma, disfagia, spasmi gravi e dolorosi dei gruppi muscolari interi, ipersalivazione, l'aspirazione, l'asfissia.	L'infezione della ferita con i <i>Clostridium tetani</i> .

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

- Microscopia
- Sierologia: p.es. ELISA

2. USO PREVISTO

Il *Clostridium tetani* toxin IgG ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per *Clostridium tetani* 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 di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letta utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Clostridium tetani toxin (IgG) micropiastre rivestita:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della Clostridium tetani toxin (toxoid); dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH 7,2 ± 0,2; colore giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione bloccante:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco.
- **Coniugato Clostridium tetani toxin anti IgG:** 1 flacone 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 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo; < 5% NMP.
- **Clostridium tetani toxin IgG Standard:** 4 flaconi, contenenti 2 ml, colore giallo, pronto all'uso.

Standard A:	0,0	IU/ml; tappo blu
Standard B:	0,1	IU/ml; tappo verde
Standard C:	0,5	IU/ml; tappo giallo
Standard D:	1,0	IU/ml; tappo rosso

I standards sono calibrati in conformità al Who International Standard; "1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human"; NIBSC Code: TE-3.

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 rivestita

Le strisce divisibili sono rivestite con l'antigeni della Clostridium tetani toxin (toxoid). Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessarie, le strisce rimanenti devono essere sigillare 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 le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del Tampone di lavaggio da 300 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 avviene.
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 de assorbanza de questo deve essere sottratto dai valori dell'assorbanza da tutti i valori delle altre assorbanze per ottenere risultati affidabili!

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

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

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

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < 0,100
- **Standard A:** Valore di assorbanza < 0,200
- **Standard B:** Valore di assorbanza > 0,150
- **Standard C:** Valore di assorbanza > 0,500
- **Standard D:** Valore di 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.

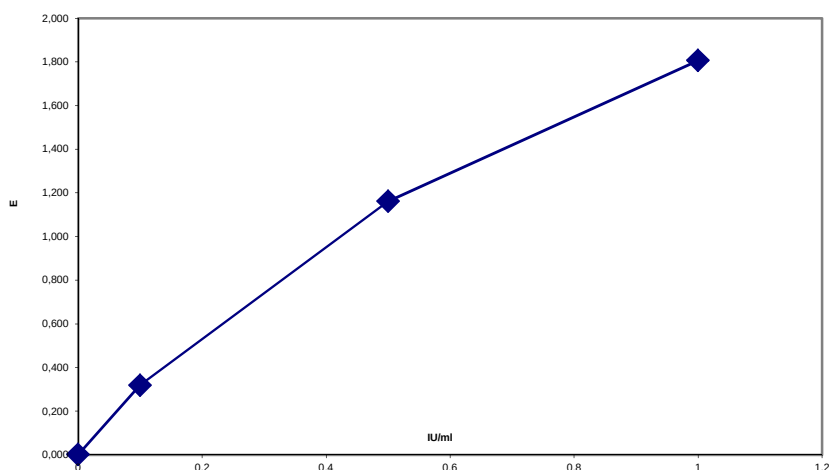
9.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere i **risultati quantitativi** in IU/ml, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli calibratori A, B, C e D sull'asse della Y e ponendo le concentrazioni (0,0 / 0,1 / 0,5, et 1,0 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.

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 e raccomandazioni [IU/ml]

< 0,1 IU/ml	Nessuna protezione, mancanza di anticorpi o la protezione da infezioni non é assicurata! Si raccomanda fare d'immediato il ciclo completo di vaccinazioni di base o una ripetizione dell'immunizzazione e il controllo dopo 4-6 settimane.
0,11 – 0,5 IU/ml	Protezione sicura da infezioni! Una ripetizione dell'immunizzazione e il controllo dopo 4-6 settimane sono raccomandati.
0,51 – 1,0 IU/ml	Protezione sicura da infezioni! Controllo dopo 2 anni raccomandato, una ripetizione dell'immunizzazione non è necessaria Nota: In caso di concentrazioni di anticorpi superiore a 0,5 IU/ml vaccinazione può causare effetti indesiderati!
1,1 - 5,0 IU/ml	Protezione a lungo! Controllo dopo 5-10 anni raccomandato
> 5.0 IU/ml	Protezione a lungo! Controllo dopo 10 anni raccomandato.

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	1,306	3,60
#2	24	1,805	3,46
#3	24	1,591	5,34
Interdosaggio	n	Media (IU/ml)	CV (%)
#1	12	0,060	9,62
#2	12	0,084	11,33
#3	12	0,658	13,99

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: 76,84% - 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 99,22% (95% intervallo di confidenza: 95,76% - 99,98%).

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 0,01 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

L'investigazione di un gruppo di campioni con attività di anticorpi contro parametri potenzialmente interferenti non ha rivelato alcuna evidenza di risultati falsamente positivi dovuto a reattività crociata.

10.7. Campo di misura

Il campo di misura è 0,01 IU/ml – 1,0 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 incrociata.
- 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:	TETG0430	Clostridium tetani toxin IgG ELISA (96 determinazioni)
----------------------	----------	--

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

El *Clostridium tetani* es una bacteria delgada, móvil, gram positivo que es capaz de formar esporas redondas en su extremo lo que se ve en el microscopio como baquetas.

El *C. tetani* es el causante del tétano que se produce cuando las esporas llegan a la zona profunda de una herida para germinar bajo circunstancias aerobias. La manifestación clínica es causada en primer lugar por la fuerte neurotoxina del tétano y menos por el comportamiento invasivo de la bacteria. La toxina bloquea la unidad motora probablemente por inhibición de la segregación de los neurotransmisores (glicina y gamma aminoácido) en las sinapsis con una afinidad alta al sistema nervioso central. El resultado es una sobreexcitación de la musculatura a estímulo externo bajo un aumento del tono muscular sin merma de la conciencia. Se producen espasmos tónicos (trismus) de la musculatura, al principio de la musculatura mímica y de la garganta seguidos por espasmos del cuello, de la espalda y del estómago. Las excursiones respiratorias pueden ser totalmente imposibles si los espasmos se manifiestan en varios grupos de músculos a la vez (opisthotonus). La hipersalivación y la dificultad de deglución provocan aspiración y neumonía. Un espasmo largo de la laringe puede provocar asfixia.

El *C. tetani* es de manifestación mundial en la mucosa intestinal humana y animal, pero sobre todo en polvo y arena. Las esporas son muy resistentes contra el calor y son infecciosas durante mucho tiempo. En áreas tropicales y calientes el tétano se manifiesta más, en Europa central la enfermedad es menor por el alto grado del estándar médico. La OMS calcula que 1 millón de personas mueren anualmente a causa del tétano.

Especies	Enfermedad	Síntomas (p.ej.)	Vía de transmisión
<i>Clostridium tetani</i>	Tétano	Trismus, disfagia, espasmos graves de varios grupos de músculos, Sialorrea, aspiración, asfixia	Contacto de una Herida con <i>Clostridium tetani</i> .

La bacteria puede ser detectada por:

- Microscopia
- Serología: p.ej. de ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático *Clostridium tetani* toxina IgG ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Clostridium tetani* toxina en suero o plasma (citrito, heparina) 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

- **Clostridium tetani toxin IgG microplaca recubierta:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Clostridium tetani toxin (toxóide), 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 Clostridium tetani toxin 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.
- **Calibradores de Clostridium tetani toxin IgG:** 4 botellas, conteniendo cada una 2 ml de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas.

Estándar A:	0,0	IU/ml; tapa azul
Estándar B:	0,1	IU/ml; tapa verde
Estándar C:	0,5	IU/ml; tapa amarilla
Estándar D:	1,0	IU/ml; tapa roja

Los Calibrados son calibrados de acuerdo con el: Who International Standard; "1st International Standard for Tetanus Immunoglobulin, Human"; NIBSC Code: TE-3.

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 Clostridium tetani toxin (toxóide). 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 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 > 0,150
- **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.

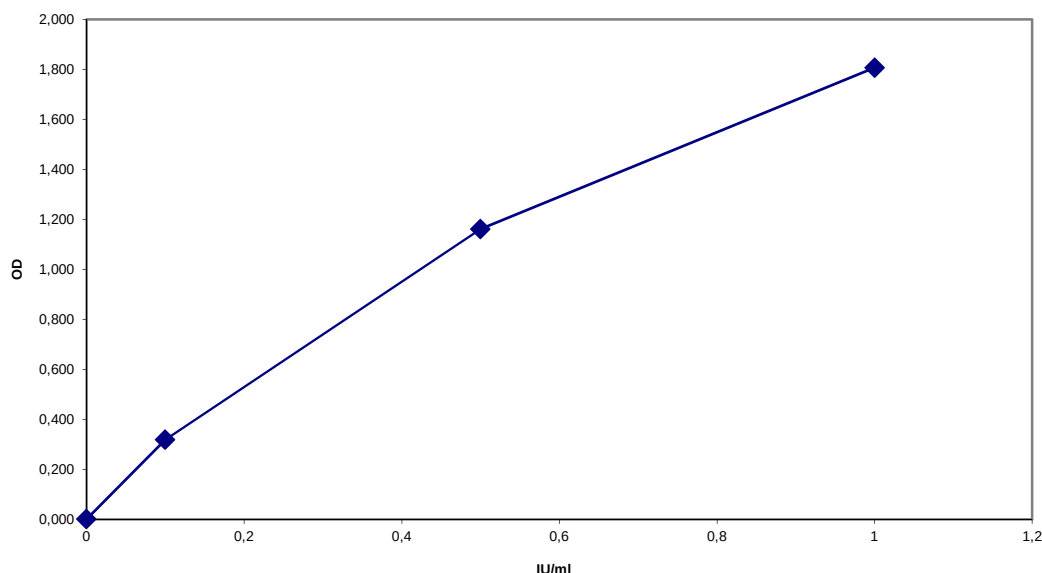
9.2. Cálculo de los resultados

Para obtener resultados cuantitativos en IU/ml, representar la (media) extinción de los calibradores A, B, C y D en papel gráfico (lineal/lineal) en el eje vertical (Y) y sus concentraciones (0,0/ 0,1/ 0,5 y 1,0 IU/ml) (eje x). Trazar la curva correspondiente.

Leer los resultados (en concentración de Clostridium tetani toxin IgG en IU/ml) 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

< 0,1 IU/ml	El Título de anticuerpos sin capacidad protectora o Protección insegura contra infecciones! Se recomienda una vacunación de base o un control del título de anticuerpos y una revacunación después de 4 a 6 semanas.
0,11 – 0,5 IU/ml	Protección segura contra infecciones! Se recomienda un control del título de anticuerpos y una revacunación después de 4 a 6 semanas.
0,51 – 1,0 IU/ml	Protección segura contra infecciones! Controlar el título de anticuerpos después de 2 años, una revacunación no es necesaria. Nota: En los casos de las concentraciones de anticuerpos superior a 0,5 IU/ml de vacuna puede causar efectos secundarios!
1,1 -5,0 IU/ml	Zona de la protección de larga duración! Se recomienda un control después de 5 a 10 años.
> 5,0 IU/ml	Zona de la protección de larga duración! Se recomienda un control después de 10 años.

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 lo 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 ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	1,306	3,60
#2	24	1,805	3,46
#3	24	1,591	5,34
Inter ensayo	n	Promedio (IU/ml)	CV (%)
#1	12	0,060	9,62
#2	12	0,084	11,33
#3	12	0,658	13,99

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: 76,84% - 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 99,22% (95% Intervalo de confianza: 95,76% - 99,98%).

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 0,01 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 0,01 IU/ml – 1,0 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:	TETG0430	Clostridium tetani toxin IgG ELISA (96 determinaciones)
------------------	----------	---

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAFIA

Ambrosch, F.; Wiedermann, G.; Müller, Hedwig (1984): Eine neue Mikro-ELISA-Methode zur Bestimmung der Tetanus-Antikörper. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 258 (2-3), pp. 173–182.

Mai, K.; Bartelheimer, H. K.; Rosin, H. (1970): Über den Stand und die Dauer des Impfschutzes gegen Tetanus bei Kindern. Auswertung anamnestischer Daten in Beziehung zum Antikörpernachweis durch die Indirekte Hämagglutination. In *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 95 (19), pp. 1044–1050. DOI: 10.1055/s-0028-1108585.

Müller, H. E.; Müller, M.; Schiek, W. (1988): Tetanus-Schutzimpfung--Indikation und Kontraindikation. In *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 113 (34), pp. 1326–1328. DOI: 10.1055/s-2008-1067815.

Nathan, Barnett R.; Bleck, Thomas P. (2006): Tetanus. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 482–491.

Schröder, J. P.; Kuhlmann, W. D. (1991): Tetanusimmunität bei Männern und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. In *Immunität und Infektion* 19 (1), pp. 14–17.

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 Etalon 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

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

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

TETG0430engl,dt,fr,it,es-05072017-Ka-gr.Lot093