

NovaLisa[®]

Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso /
Instrucciones de uso / Instruções de utilização**

English	2
Deutsch	7
Français	12
Italiano	17
Español	22
Português	27
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	34
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem	34
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

REF

PCORG009 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The *Corynebacterium diphtheriae* toxin 5S IgG plus ELISA is intended for the quantitative determination of IgG class antibodies against *Corynebacterium diphtheriae* toxin in human serum or plasma (citrate, heparin).

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break apart 8-well snap-off strips coated with *Corynebacterium diphtheriae* toxin (toxoid) antigens; in resealable aluminium foil.
- **DIL:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; ≤ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **WASH BUF 20x:** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgG in phosphate buffer (10 mM); coloured blue; ready to use; black cap.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1%; ready to use; yellow cap.
- **Control:** 1 bottle containing 2 mL; coloured yellow; ready to use; orange cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **Standards:** 5 vials, each containing 2 mL standard; coloured yellow; ready to use; ≤ 0.02% (v/v) MIT.

Standard A:	0.000	IU/mL; blue cap
Standard B:	0.015	IU/mL; green cap
Standard C:	0.075	IU/mL; yellow cap
Standard D:	0.150	IU/mL; red cap
Standard E:	1.000	IU/mL; white cap

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

For hazard and precautionary statements see 11.1.

3.2. Materials supplied

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

3.3. Materials and Equipment needed

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

4. STABILITY AND STORAGE

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

5. REAGENT PREPARATION

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

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with *Corynebacterium diphtheriae* toxin (toxoid) antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

5.2. **WASH BUF 20x**

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

5.3. **SUB TMB**

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

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

6.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL**. Dispense 10 µL sample and 1 mL **DIL** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of **WASH BUF 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

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

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

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH BUF 1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL **SUB TMB** into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 µL **SOLN STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for **SUB TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of **SOLN STOP**.

7.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader **to zero** using the **Substrate Blank**.

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

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

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

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these instructions for use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate blank:** Absorbance < 0.100
- **Standard A:** Absorbance < 0.200
- **Standard B:** Absorbance > 0.050
- **Standard C:** Absorbance > Standard B
- **Standard D:** Absorbance > Standard C
- **Standard E:** Absorbance > 0.800
- **Control:** Result IU/mL within range indicated on the label.

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D < Standard E

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

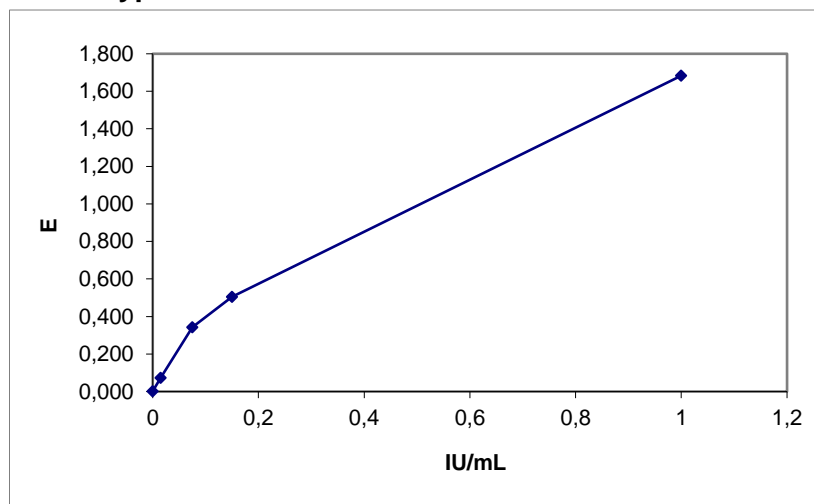
8.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in IU/mL** plot the (mean) absorbance values of the 5 Standards A, B, C, D and E on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0.000, 0.015, 0.075, 0.150, 1.000 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 specimen and control.

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

8.3. Typical standard Curve



8.4. Interpretation of Results

according to: RKI 1999

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

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1. Precision

Intraassay	n	Mean value (E)	CV (%)
#1	24	1.347	3.85
#2	24	1.843	3.86
#3	24	0.527	3.02
Interassay	n	Mean value (IU/mL)	CV (%)
#1	12	0.00783	12.95
#2	12	0.03447	6.99
#3	12	0.03539	6.86

9.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 100% (95% confidence interval: 89.42% - 100%).

9.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100% (95% confidence interval: 95.44% - 100%).

9.4. Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity (according to CLSI EP17-A) is defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator. It is 0.00235 IU/mL.

9.5. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

9.6. Cross Reactivity

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

9.7. Measurement range

The measurement range is 0.00235 IU/mL – 1.00 IU/mL.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE


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

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS


- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning 	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing spray.
	P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
	P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

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

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. Disposal Considerations

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

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

12. ORDERING INFORMATION

REF	PCORG009	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus	(96 Determinations)
------------	----------	---	---------------------

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA ist für den quantitativen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen Corynebacterium diphtheriae toxin in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

2. 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 Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschritt 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.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid) Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 ± 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH BUF 20x:** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG in Phosphatpuffer (10 mM); blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **SUB TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1%; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL; gelb gefärbt; orange Verschlusskappe; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Standards:** 5 Fläschchen mit 2 mL Standardlösung; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
Standard A: 0,000 IU/mL; blaue Verschlusskappe
Standard B: 0,015 IU/mL; grüne Verschlusskappe
Standard C: 0,075 IU/mL; gelbe Verschlusskappe
Standard D: 0,150 IU/mL; rote Verschlusskappe
Standard E: 1,000 IU/mL; weiße Verschlusskappe

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

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

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

4. 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.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

5.1. Mikrotiterplatte

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

5.2. WASH BUF 20x

WASH BUF 20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer (WASH BUF 1x) 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.

5.3. SUB TMB

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

6. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. 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.

6.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1 + 100 mit DIL verdünnen, z. B. 10 µL Probe und 1 mL DIL in die entsprechenden Rörchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1 + 100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsanweisung vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung 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 bis zu fünf und das WASH BUF 1x -Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11. beachten. Vor Testbeginn 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 ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL WASH BUF 1x 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 SUB TMB 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 SOLN STOP in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe von SUB TMB 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 von SOLN STOP messen.

7.1. 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 notieren.

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

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

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Substrat-Leerwert:** Extinktionswert < 0,100
- **Standard A:** Extinktionswert < 0,200
- **Standard B:** Extinktionswert > 0,050
- **Standard C:** Extinktionswert > Standard B
- **Standard D:** Extinktionswert > Standard C
- **Standard E:** Extinktionswert > 0,800
- **Kontrolle:** Ergebnis in IU/mL innerhalb des auf dem Etikett angegebenen Bereiche

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D < Standard E

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

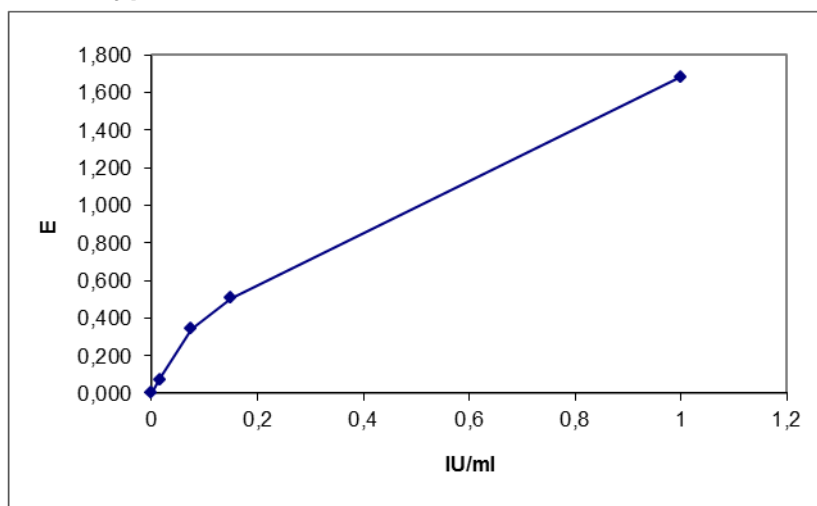
8.2. Messwertberechnung

Um quantitative Ergebnisse in IU/mL zu erhalten, werden die Extinktionswerte der fünf Standards A, B, C, D und E gegen ihre entsprechende Konzentration (0,000; 0,015; 0,075; 0,150; 1,0 IU/mL) aufgetragen und eine Standardkurve erstellt (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

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

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

8.3. Typische Standardkurve



8.4. Interpretation der Ergebnisse

In Anlehnung an: RKI 1999

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

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

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

9. TESTMERKMALE

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

9.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Interassay	n	Mittelwert (IU/mL)	Vk (%)
#1	12	0,00783	12,95
#2	12	0,03447	6,99
#3	12	0,03539	6,86

9.2. Diagnostische Spezifität

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

9.3. Diagnostische Sensitivität

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

9.4. 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 0,00235 IU/mL.

9.5. Interferenzen

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

9.6. Kreuzreaktivität

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

9.7. Messbereich

Der Messbereich ist 0,00235 IU/mL – 1,00 IU/mL.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind 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 qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF	PCORG009	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus	(96 Bestimmungen)
------------	----------	---	-------------------

FRANÇAIS

1. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA est prévue pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-Corynebacterium diphtheriae toxin dans le sérum humain ou plasma (citrate, héparine).

2. PRINCIPE DU TEST

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

Plaques de Microtitrage 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 photomètre de Plaques de Microtitrages ELISA.

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

- **Plaques de Microtitrage:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène de Corynebacterium diphtheriae toxine (anatoxine); en sachets d'aluminium refermables.
- **DIL:** 1 flacon contenant 100 mL de tampon phosphaté (10 mM) pour la dilution de l'échantillon; pH 7,2 ± 0,2; prêt à l'emploi; couleur jaune; bouchon blanc; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **WASH BUF 20x:** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc ; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugué:** 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.
- **SUB TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1%; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle:** 1 flacon contenant chacun 2 mL, de couleur jaune, bouchon orange, prêt à l'emploi; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Étalons:** 5 flacons contenant chacun 2 mL étalon; de couleur jaune; prêt à l'emploi; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
Étalon A: 0,000 IU/mL; bouchon bleu
Étalon B: 0,015 IU/mL; bouchon vert
Étalon C: 0,075 IU/mL; bouchon jaune
Étalon D: 0,150 IU/mL; bouchon rouge
Étalon E: 1,000 IU/mL; bouchon blanc

Les étalons sont calibrés selon le standard OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012).

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 11.1

3.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

3.3. Matériel et équipement requis

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

4. 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.

5. 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!

5.1. Plaques de Microtitrage

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

5.2. WASH BUF 20x

Diluer WASH BUF 20x 1+19; par exemple 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon diluée (WASH BUF 1x) 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.

5.3. SUB TMB

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

6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. 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.

6.1. Dilution de l'échantillon

Avant du test, tous les échantillons doivent être dilués 1 + 100 avec DIL. Diluer 10 µL d'échantillon avec 1 mL DIL dans des tubes pour obtenir une dilution 1 + 100 et mélanger soigneusement sur un Vortex.

7. PROCEDE DE TESTE

Lire attentivement le notice 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 WASH BUF 1x de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 11. 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. 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 WASH BUF 1x. 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 SUB 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 SOLN STOP dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la SUB 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 SOLN STOP.

7.1. Mesure

Réglez le Photomètre de Plaque de Microtitrages ELISA à **zéro** en utilisant le **Blanc substrat**.

Si - pour des raisons techniques - le Photomètre de Plaque de Microtitrages 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.

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**.

8. RESULTATS

8.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ce notice d'utilisation doivent être strictement suivies, et 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 > **0,050**
- **Etalon C:** Valeur d'absorbance > **Etalon B**
- **Etalon D:** Valeur d'absorbance > **Etalon C**
- **Etalon E:** Valeur d'absorbance > **0,800**
- **Contrôle:** Résultats en IU/mL au sein de la zone précisé à l'étiquette

Etalon A < Etalon B < Etalon C < Etalon D < Etalon E

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

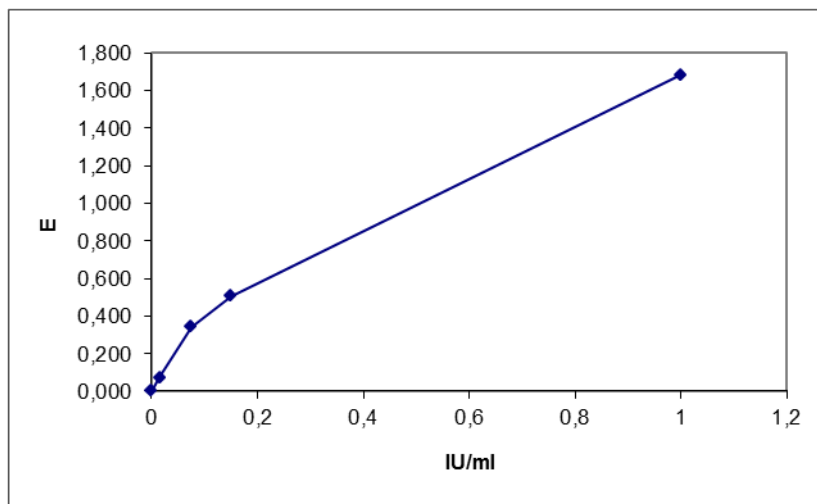
8.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats quantitatifs en IU/mL, utiliser du papier millimétré bilinéaire. Inscrire les valeurs (moyennes) d'absorbance des 5 étalons A, B, C, D et E en ordonnées et leurs concentrations correspondantes (0,0; 0,015; 0,075; 0,150; 1,0 IU/mL) en abscisses, et dessiner une courbe d'étalonnage.

Lire les résultats sur cette courbe d'étalonnage en utilisant les valeurs (moyennes) d'absorbance de chaque échantillon patient et des contrôles.

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

8.3. Courbe d'étalonnage type



8.4. Interprétation des résultats

En référence à: RKI 1999

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

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

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

9. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

9.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Inter-essais	n	moyenne (IU/mL)	CV (%)
#1	12	0,00783	12,95
#2	12	0,03447	6,99
#3	12	0,03539	6,86

9.2. 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% (95% Intervalle de confiance: 89,42% - 100%).

9.3. Sensibilité diagnostique

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

9.4. Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique (selon CLSI EP17-A) définie comme la concentration apparente de l'analyte qui peut être distinguée de l'étalon zéro est 0,00235 IU/mL.

9.5. Interférences

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

9.6. 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.

9.7. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est 0,00235 IU/mL – 1,00 IU/mL.

10. LIMITES DE LA TECHNIQUE


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

11. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS


- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse 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 Plaques de Microtitrage 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.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

11.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention	H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
	P261	Éviter de respirer les aérosols.
	P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
	P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
	P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
	P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

Les réactifs peuvent contenir du 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (voir chapitre 3.1).
Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention	H315	Provoque une irritation cutanée.
	H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
	P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
	P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
	P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
	P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

11.2. Elimination des déchets

Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux. Contactez les autorités locales ou les entreprises de gestion des déchets qui vous donneront des conseils sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

12. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	PCORG009	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus	(96 déterminations)
------------	----------	---	---------------------

ITALIANO

1. USO PREVISTO

Il Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per Corynebacterium diphtheriae toxin nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

2. PRINCIPIO DEL TEST

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

Piastre di Microtitolazione 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 letto utilizzando un fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della Corynebacterium diphtheriae toxin (toxoid); dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **DIL:** 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; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **WASH BUF 20x:** 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; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 20 mL di anticorpi IgG anti-umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **SUB TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1%; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo:** 1 flacone da 2 mL; colore giallo; pronto all'uso; tappo arancio; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **Standards:** 5 flaconi, contenenti 2 mL; color giallo; pronto all'uso; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
 - Standard A: 0,000 IU/mL; tappo blu
 - Standard B: 0,015 IU/mL; tappo verde
 - Standard C: 0,075 IU/mL; tappo giallo
 - Standard D: 0,150 IU/mL; tappo rosso
 - Standard E: 1,000 IU/mL; tappo bianco

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

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1

3.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

3.3. Materiali e attrezzature necessari

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

4. 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.

5. 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.

5.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con l'antigeni della *Corynebacterium diphtheriae* toxin (toxoid). Immediatamente dopo la rimozione degli strisce necessari, 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.

5.2. WASH BUF 20x

Diluire WASH BUF 20x 1+19; per esempio. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone diluito (WASH BUF 1x) 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.

5.3. SUB TMB

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

6. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. 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/scongelo.

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

6.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1+100 con DIL. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µL di campione + 1 mL DIL e mescolare bene (Vortex).

7. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso prima di iniziare il teste. 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 de 3 a 5 volte e il volume del WASH BUF 1x da 300 a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). 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 ± 5 min a 37 ± 1°C.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µL WASH BUF 1x. 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 SUB 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 SOLN STOP in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della SUB TMB, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
11. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta SOLN STOP.

7.1. Misurazione

Regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione ELISA a zero usando il substrato-Bianco (Blank).

Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro per le Piastre di Microtitolazione 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 registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

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**.

8. RISULTATI

8.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti Istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Substrato Bianco (Blank):** Assorbanza < 0,100
- **Standard A:** Assorbanza < 0,200
- **Standard B:** Assorbanza > 0,050
- **Standard C:** Assorbanza > Standard B
- **Standard D:** Assorbanza > Standard C
- **Standard E:** Assorbanza > 0,800
- **Controllo:** risultato in IU/mL entro il range indicato sull'etichetta

Standard A < Standard B < Standard C < Standard D < Standard E

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

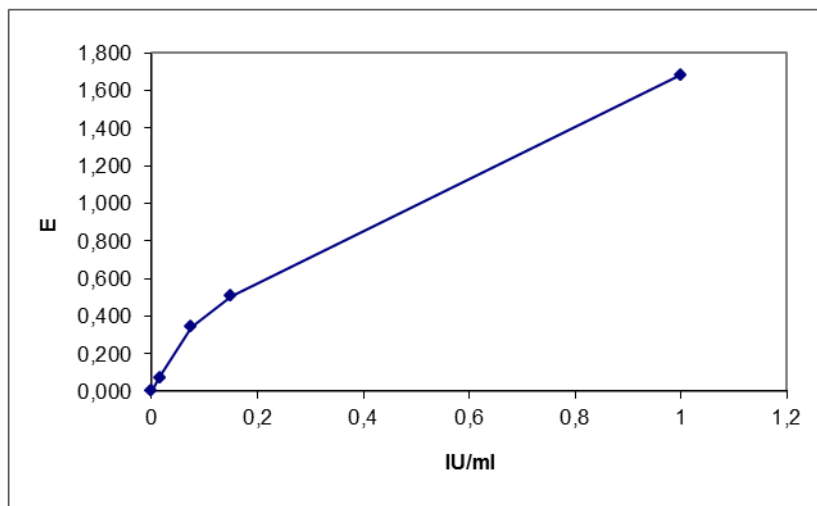
8.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere i **risultati quantitativi in IU/mL**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze dei calibratori A, B, C, D e E sull'asse della Y e ponendo le concentrazioni (0,0; 0,015; 0,075; 0,150; 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 standard utilizzando i valori (medi) assorbanza campione di ogni singolo paziente e controllo.

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

8.3. Tipica curva standard



8.4. Interpretazione dei risultati

in accordo con: RKI 1999

< 0,01 IU/mL	Livello di anticorpi non protettivo! Si raccomanda un'immediata immunizzazione di base completa!
0,01 – 0,09 IU/mL	Protezione non affidabile! Si raccomanda un immediato richiamo dell'immunizzazione.
0,1 – 1,0 IU/mL	Protezione affidabile!
> 1,0 IU/mL	Protezione a lungo termine affidabile: Dopo circa 10 anni dall'ultimo richiamo si raccomanda un controllo e un nuovo richiamo. I raccomanda che l'immunizzazione di base o il richiamo siano controllati dopo 4-6 settimane dopo l'immunizzazione e che la data sia riportata sul certificato di vaccinazione.

La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente.

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

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

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

9.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Interdosaggio	n	Media (IU/mL)	Cv (%)
#1	12	0,00783	12,95
#2	12	0,03447	6,99
#3	12	0,03539	6,86

9.2. 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% (95% intervallo di confidenza: 89,42% - 100%).

9.3. Sensibilità diagnostica

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

9.4. Sensibilità analitica

La sensibilidad analítica (secondo CLSI EP17-A) se define como la menor concentración que se puede distinguir del estándar cero. Es de 0,00235 IU/mL.

9.5. 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.

9.6. Reattività incrociata

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

9.7. Campo di misura

Il campo di misura 0,00235 IU/mL – 1,00 IU/mL.

10. LIMITAZIONI

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

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- 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 simili 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 gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

11.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione



H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

Attenzione



H315	Provoca irritazione cutanea.
H319	Provoca grave irritazione oculare
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

11.2. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

12. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF	PCORG009	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus	(96 determinazioni)
------------	----------	---	---------------------

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El enzoinmunoensayo *Corynebacterium diphtheriae* toxin 5S IgG plus ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos contra *Corynebacterium diphtheriae* toxin en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

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

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul.

La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Corynebacterium diphtheriae* toxin (toxóide), en bolsa de aluminio.
- **DIL:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH 7,2 ± 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **WASH BUF 20x:** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgG anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color azul; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **SUB TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), < 0,1%; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control:** 1 botella de 2 mL de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas, tapa naranja; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Soluciones estandar:** 5 botellas, conteniendo cada una 2 mL de solución coloreada en amarillo listas para ser utilizadas; ≤ 0,02% (v/v) MIT.

Estándar A:	0,000	IU/mL; tapa azul
Estándar B:	0,015	IU/mL; tapa verde
Estándar C:	0,075	IU/mL; tapa amarilla
Estándar D:	0,150	IU/mL; tapa roja
Estándar E:	1,000	IU/mL; tapa blanca

Los estándares se calibran de acuerdo con la norma de la OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012)".

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

3.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3. Materiales e instrumentos necesarios

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

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

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

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

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

5.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígeno de *Corynebacterium diphtheriae* toxin (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.

5.2. WASH BUF 20x

Diluir WASH BUF 20x 1+19; por ejemplo 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL de agua destilada. El Tampón diluido (WASH BUF 1x) es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3. SUB TMB

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

6. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

6.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con DIL, por ejemplo 10 µL de la muestra con 1 mL DIL, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

7. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de WASH BUF 1x de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado). Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°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 ± 5 min a 37 ± 1°C.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL WASH BUF 1x. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es muy importante! ¡Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 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 número 4.
8. Pipetear 100 µL SUB 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 SOLN STOP en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con SUB TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir SOLN STOP.

7.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

¡Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

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

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

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < 0,100
- **Estándar A:** valor de la extinción < 0,200
- **Estándar B:** valor de la extinción > 0,050
- **Estándar C:** valor de la extinción > Estándar B
- **Estándar D:** valor de la extinción > Estándar C
- **Estándar E :** valor de la extinción > 0,800
- **Control:** Resultados en IU/mL dentro de region indicar en etiqueta

Estándar A < Estándar B < Estándar C < Estándar D < Estándar E

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

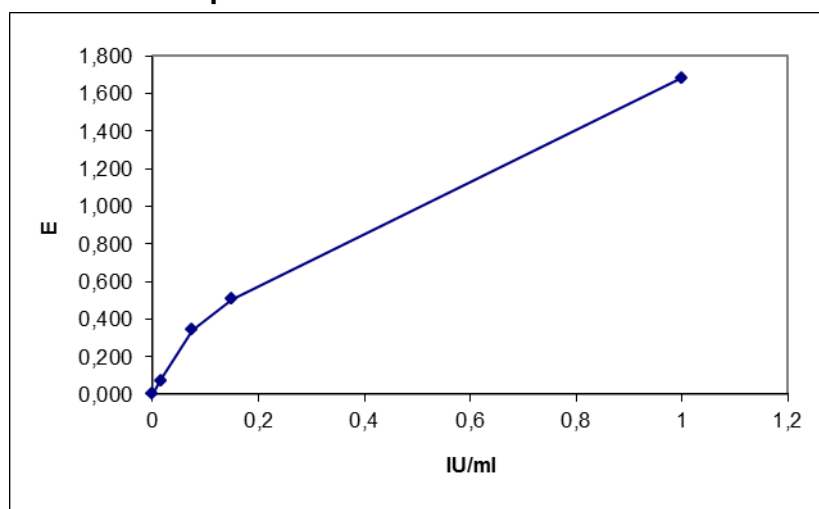
8.2. Cálculo de los resultados

Para obtener resultados cuantitativos en IU/mL, representar la (media) del valor de la extinción de los estándares A, B, C, D y E en papel gráfico (lineal/Lineal) en el eje vertical (Y) y sus concentraciones (0,0; 0,015; 0,075; 0,150; 1,0 IU/mL) en el eje horizontal (X). Trazar la curva correspondiente.

Leer los resultados a partir de esta curva utilizando para ello los valores de la (media) absorbancia de pacientes y controles.

Para el cálculo de la curva estándar se debe utilizar la función matemática punto a punto.

8.3. Curva típica de estándar



8.4. Interpretación de los resultados

de acuerdo con : RKI 1999

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

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico.

Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

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

9.1. Precisión

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

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

9.2. Especificidad diagnóstica

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

9.3. Sensibilidad de diagnóstico

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

9.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (según CLSI EP17-A) se define como la menor concentración que se puede distinguir del estándar cero. Es de 0,00235 IU/mL.

9.5. 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.

9.6. Reactividad cruzada

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

9.7. Intervalo de medición

El intervalo de medición es 0,00235 IU/mL – 1,00 IU/mL.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

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

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para 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 Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

11.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1).
Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

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

Atención



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

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

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

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

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

12. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

REF	PCORG009	Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus	(96 determinaciones)
------------	----------	---	----------------------

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA destina-se à determinação quantitativa de anticorpos da classe IgG contra Corynebacterium diphtheriae toxin no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

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

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

A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reacção. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotómetro de Placa de Microtitulação ELISA.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com antigénio de Corynebacterium diphtheriae toxin (toxóide), em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **DIL:** 1 frasco contendo 100 mL de tampão fosfato (10 mM) para diluição da amostra, pH 7,2 ± 0,2; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca; ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
- **WASH BUF 20x:** 1 frasco contendo 50 mL de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH 7,2 ± 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 20 mL de anticorpo para IgG humana marcados com peroxidase no tampão fosfato (10 mM); de cor azul, pronto a usar; tampa preta.
- **SUB TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1%; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle:** 1 frasco, contendo 2 mL cada, de cor amarela; pronto a usar, tampa laranja; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **Calibradores:** 5 frascos, contendo 2 mL cada, de cor amarela; pronto a usar; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
Calibrador A: 0,000 IU/mL; tampa azul
Calibrador B: 0,015 IU/mL; tampa verde
Calibrador C: 0,075 IU/mL; tampa amarela
Calibrador D: 0,150 IU/mL; tampa vermelha
Calibrador E: 1,000 IU/mL; tampa branca

Os calibradores são calibrados de acordo com a norma OMS, "1st International Standard for Diphtheria Antitoxin Human IgG" (WHO, 2012)".

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

3.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de utilização

3.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotómetro de Placa de Microtitulação ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem de Placas de Microtitulação
- Pipetas para dispensar volumes entre 10 e 1000 µL
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

4. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

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

5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

5.1. Placa de Microtitulação

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

5.2. WASH BUF 20x

Diluir WASH BUF 20x 1+19; por exemplo. 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL de água destilada. O Tampão diluído (WASH BUF 1x) é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

5.3. SUB TMB

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

6. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

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

Não é recomendada a inactivação por calor das amostras.

6.1. Diluição das amostras

Antes de testar todas as amostras devem ser diluídas 1 + 100 com DIL. Dispensar 10 µL de amostra e 1 mL DIL em tubos para obter uma diluição 1 + 100 e misturar meticulosamente com um vortex.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de utilização **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita às instruções de utilização, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar os passos de lavagem de três até cinco e o volume WASH BUF 1x de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 11. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e calibradores/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

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

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

Ajustar a incubadora para 37 ± 1 °C.

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

7.1. Medição

Ajustar o fotómetro para Placa de Microtitulação ELISA a zero usando o Branco substrato.

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

Medir a absorvância de todos os poços a 450 nm e registar os valores da absorvância para cada calibrador/controle e amostra.

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

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

8. RESULTADOS

8.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas Instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **Blanco:** Valor de Absorvância < 0,100
- **Calibrador A:** Valor de Absorvância < 0,200
- **Calibrador B:** Valor de Absorvância > 0,050
- **Calibrador C:** Valor de Absorvância > Calibrador B
- **Calibrador D:** Valor de Absorvância > Calibrador C
- **Calibrador E:** Valor de Absorvância > 0,800
- **Controle:** resultados em IU/mL dentro ambito indicar em etiqueta

Calibrador A < Calibrador B < Calibrador C < Calibrador D < Calibrador E

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

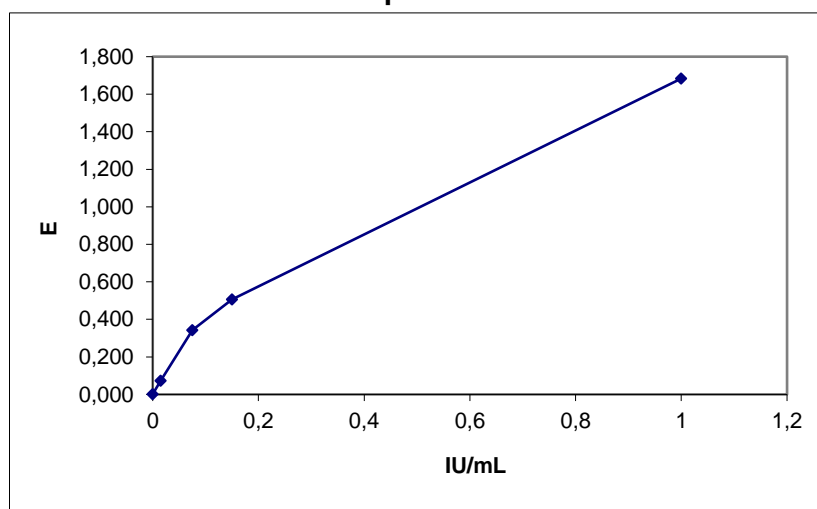
8.2. Cálculo dos Resultados

Para obter resultados quantitativos em IU/mL coloque os valores (médios) de absorvância dos 5 calibradores A, B, C, D e E em papel para gráficos (milimétrico) num sistema de coordenadas contra as suas respectivas concentrações (0,000; 0,015; 0,075; 0,150 e 1,0 IU/mL) e desenhe uma curva de standard normal (valores de absorvância no eixo vertical dos y, concentrações do eixo horizontal dos x).

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

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

8.3. Curva de standard típica



8.4. Interpretação dos Resultados

de acordo com: RKI 1999

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

O diagnóstico de uma doença infecciosa não deve ser estabelecido com base num único resultado do teste. Um diagnóstico preciso deve ter em consideração a história clínica, a sintomatologia bem como dados serológicos.

Em pacientes imunossuprimidos e recém-nascidos os dados serológicos têm apenas valor restrito.

9. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

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

9.1. Precisão

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
#1	24	1,347	3,85
#2	24	1,843	3,86
#3	24	0,527	3,02
Inter ensaio	n	Média (IU/mL)	CV (%)
#1	12	0,00783	12,95
#2	12	0,03447	6,99
#3	12	0,03539	6,86

9.2. Especificidade Diagnóstica

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

9.3. Sensibilidade Diagnóstica

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

9.4. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica (segundo CLSI EP17-A) – definida como a concentração aparente do analito que pode ser distinguida do calibrador zero – é 0,00235 IU/mL.

9.5. Interferências

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

9.6. Reação cruzada

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

9.7. Intervalo de medição

O intervalo de medição é 0,00235 IU/mL – 1,00 IU/mL.

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

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

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções de utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e/ou juntar reagentes ou Placa de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
- nenhuns reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos calibradores/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
- O ELISA é projetado apenas para pessoal qualificado seguindo os padrões de boas práticas de laboratório (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

11.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 3.1).

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar os aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Os reagentes podem conter 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (ver capítulo 3.1).

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H315	Provoca irritação cutânea.
H319	Provoca irritação ocular grave.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P337+P313	Caso a irritação ocular persista: Consulte um médico.

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

11.2. Considerações de Eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulamentada através de leis e regulamentos nacionais e regionais. Contacte as suas autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que darão conselhos sobre como eliminar os resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.

12. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

REF

PCORG009


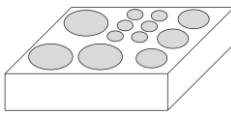




Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus

(96 Determinações)
















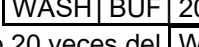
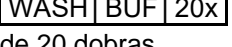
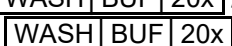
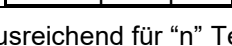

ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

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

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22
SOLN STOP WASH BUF 20x SUB TMB DIL CONJ CAL CONTROL		MTP
 HDPE 2	 PP 5	 PET / ALU / LDPE 90

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

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
	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 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 marking / CE-Kennzeichnung / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos
	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastra di Microtitolazione / Placa de Microtitulacions / Placa de Microtitulação
	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
	Standard or Calibrator A-E / Standard oder Kalibrator A-E / Standard o Etalon A-E / Standard o Calibratore A-E / Estándar o Calibrador A-E/ Standard ou Calibrador A-E
	Control/ Kontrolle/ Contrôle/ Controllo/ Control/ Controle
	(Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer / Tampon de Dilution d'Échantillon / Tampone di Diluizione del Campione / Tampón de Dilución de Muestras / Tampão de Diluição de Amostra)
	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio
	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución Substrato TMB / Solução Substrato TMB
	"Washing Buffer (20x concentrated)";  W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampone di Lavaggio concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	20-fold dilution of  / 20-fach Verdünnung von  / Dilution 20 fois du  / Diluizione 20 volte del  / Dilución de 20 veces del  / Diluição de 20 dobras do 
	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

SUMMARY OF TEST PROCEDURE / KURZANLEITUNG TESTDURCHFÜHRUNG / RÉSUMÉ DE LA PROCEDURE DE TEST / SCHEMA DELLA PROCEDURA / RESUMEN DE LA TÉCNICA / RESUMO DO PROCEDIMENTO DE TESTE

SCHEME OF THE ASSAY

Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Control	Sample (diluted 1+100)
Standard A	-	100 µL	-	-	-	-	-	-
Standard B	-	-	100 µL	-	-	-	-	-
Standard C	-	-	-	100 µL	-	-	-	-
Standard D	-	-	-	-	100 µL	-	-	-
Standard E	-	-	-	-	-	100 µL	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x								
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of WASH BUF 1x								
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark								
SOLN STOP	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)								



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

PCORG009_IFU_rev01_fromLot_129N