

**NovaLisa™**

# **Corynebacterium diphtheriae toxin 5S**

## **IgG plus- ELISA**



Enzyme immunoassay for the quantitative determination of IgG-class antibodies against Corynebacterium diphtheriae toxin in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur quantitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen Corynebacterium diphtheriae Toxin in Humanserum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination quantitative des anticorps IgG dirigés contre la toxine du Corynebacterium diphtheriae dans le sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione quantitativa degli anticorpi della classe IgG per la tossina del Corynebacterium diphtheriae nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra –Corynebacterium difteriae en suero o plasma humano

### **Only for in-vitro diagnostic use**

|           |           |          |
|-----------|-----------|----------|
| English:  | Page      | 2 to 7   |
| Deutsch:  | Seite     | 8 bis 13 |
| Francais: | Page      | à        |
| Italiano: | da Pagina | 14 a 19  |
| Espanol:  | Página    | a        |

For further languages please contact our authorized distributors.

|  |   |    |
|--|---|----|
| Bibliography / Literatur / Bibliographie /<br>Bibliografia / Bibliografia  | Page / Seite / Page /<br>Pagina / Página  | 22 |
| Symbols Key / Symbolschlüssel /<br>Explication des symboles / Legenda / Símbolos   | Page / Seite / Page /<br>Pagina / Página  | 23 |
| Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung<br>Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/<br>Schema della procedura/ Resumen de la técnica | Page / Seite / Page/<br>/ Pagina / Página | 24 |

---

Product Number: PCORG009 (96 Determinations)

---

## 1. INTRODUCTION

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

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

| Species                            | Disease                  | Symptoms  | Mechanism of Infection   |
|------------------------------------|--------------------------|---|--|
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Diphtheria (respiratory) | sore throat and low-grade fever<br>swelling of the neck (“bull neck”) from inflammation<br><br>Complications: exotoxin-induced damage to other organs | Transmission from person to person through close physical and respiratory contact<br><br>Transmission is increased in overcrowded and poor socio-economic conditions |

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

- Microscopy: Gram stain
- Serology: Detection of toxin production by ELISA

## 2. INTENDED USE

The NovaTec *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). This allows the determination of the immune status of the patients facilitating individual recommendations about the necessity of a basic immunization or booster injection.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative immunoenzymatic determination of IgG-class antibodies against *C. diphtheriae* toxin is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterstrip wells are precoated with inactivated specific *Corynebacterium diphtheriae* toxin (toxoid) antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgG conjugate is added. This conjugate binds to the captured *C. diphtheriae* toxin-specific antibodies. 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 *C. diphtheriae* toxin-specific IgG antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **C. diphtheriae toxin Coated Wells (IgG):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with *C. diphtheriae* toxin (toxoid) antigens; in resealable aluminium foil.
- **IgG Sample Diluent\*\*\*:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x Concentrate)\*:** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer for washing the wells; pH 7.2 ± 0.2; white cap.

- **C. diphtheriae toxin anti-IgG Conjugate\*\*:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled antibodies to human IgG; coloured blue; ready to use; black cap.
  - **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
  - **C. diphtheriae toxin 5S IgG Additional Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; orange cap.
  - **C. diphtheriae toxin 5S IgG Standards\*\*\*:** 5 vials, each containing 2ml, coloured yellow; ready to use:
 

|             |         |                   |
|-------------|---------|-------------------|
| Standard A: | 0.000   | IU/ml; blue cap   |
| Standard B: | 0.015   | IU/ml; green cap  |
| Standard C: | 0.075   | IU/ml; yellow cap |
| Standard D: | 0.150   | IU/ml; red cap    |
| Standard E: | ..1.000 | IU/ml; white cap  |
- \* contains 0.1 % Bronidox L after dilution  
 \*\* contains 0.2 % Bronidox L  
 \*\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

## 4.3. Materials and Equipment needed

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

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

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

## 6. REAGENT PREPARATION

---

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

### 6.1. Coated Snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with C. diphtheriae toxin (toxoid) antigens. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2... 8 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. C. diphtheriae toxin anti-IgG Conjugate

The bottle contains 20 ml conjugate with the components anti-human IgG horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert blue dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.3. Additional Control

The bottle labelled with Additional Control contains a ready to use control solution. The concentration in IU/ml is printed on the label. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.4. Standards

The vials labelled with Standard A, B, C, D and E contain a ready to use standard solution. The concentration of the standards, calibrated in accordance with the "International Standard for Diphtheria Antitoxin (00/496)", are:

|             |         |       |
|-------------|---------|-------|
| Standard A: | 0.000   | IU/ml |
| Standard B: | 0.015   | IU/ml |
| Standard C: | 0.075   | IU/ml |
| Standard D: | 0.150   | IU/ml |
| Standard E: | ..1.000 | IU/ml |

The solutions have to be stored at 2...8°C and contain 0.1% Kathon. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.5. IgG Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.6. Washing Solution (20x conc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.7. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a Tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.8. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26), ready to use, store at 2...8°C. After first opening stability until expiry date.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

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

### 7.1. Sample Dilution

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

For patients with expected **antitoxin concentrations greater than Standard E** (1.00 IU/ml) a second 1 + 1 dilution of this 1 + 100 diluted patient sample should be performed; e.g. 100 µl of first sample dilution + 100 µl of IgG sample diluent (mix well). Dilution factor: 2

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

|         |                     |                                |
|---------|---------------------|--------------------------------|
| 1 well  | (e.g. A1)           | for the substrate blank,       |
| 5 wells | (e.g. B1, C1, etc.) | for Standard A, B, C, D and E. |
| 1 well  | (e.g. G1)           | for Additional control.        |

*It is recommended to determine patient samples in duplicate.*

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

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

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl of each Standard (A, B, C, D and E), control and diluted sample into the respective wells. Leave well A1 for 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 off the wells and wash each well three times with 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
*Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.*
5. Dispense 100µl C. diphtheriae anti-IgG Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25°C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells

9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25°C) in the dark.**

10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*

*Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Dilute the specimen as mentioned under 7.1. Sample Dilution.*

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

## 8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the substrate blank in well A1.

*If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 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 and patient sample in the distribution and identification plan.

*Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.*

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Assay Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance < **0,100**
- **Standard A** in B1: Absorbance < **0,200**
- **Standard B** in C1: Absorbance > **0,050**
- **Standard C** in D1: Absorbance > **0,200**
- **Standard D** in E1: Absorbance > **0,400**
- **Standard E** in F1: Absorbance > **1,000**
- **Additional control** in G1: 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.

### 9.2. Calculation of Results

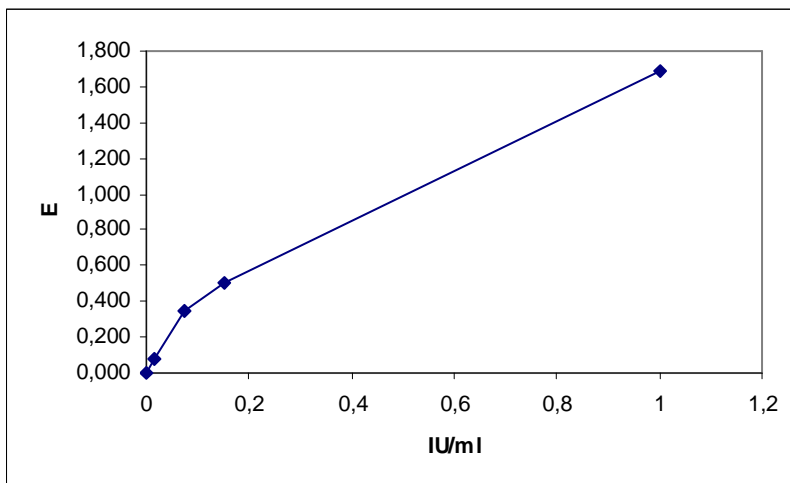
In order to obtain **quantitative results in IU/ml** plot the (mean) absorbance values of the 5 Standards A, B, C, D and E on (linear/linear) graph paper in a system of coordinates against their corresponding concentrations (0.000, 0.015, 0.075, 0.150, 1.000 IU/ml) and draw a standard calibration curve (absorbance values on the vertical y-axis, concentrations on the horizontal x-axis).

Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each patient specimen and control.

*Note: Readings of additionally (1+1) diluted patient samples must be multiplied by the appropriate dilution factor in order to obtain correct results! (Dilution: 1+1 = Dilution factor: 2).*

All suitable computer programs available can be used for automated result reading and calculation.

### 9.3. Typical Calibration Curve



## 9.4. Interpretation of Results and Recommendations [ IU/ml]\*

Each result should be carefully assessed by a physician.

|             |   |
|-------------|---|
| < 0.01      | <b>No protective antibody level!</b><br>Immediate full course of basic immunization is recommended! |
| 0.01 - 0.09 | <b>No reliable protection!</b><br>Immediate booster injection is recommended.                       |
| 0.1 – 1.0   | <b>Reliable protection!</b>   |
| > 1.0       | <b>Reliable long term protection!</b>   |

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.

\* according to: RKI 1999

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

| Intraassay | n  | Mean value (OD) | CV (%) |
|------------|----|-----------------|--------|
| Weak pos.  | 24 | 0.95            | 12.1   |
| Pos.       | 24 | 3.02            | 2.1    |

| Interassay | n  | Mean value (IU/ml) | CV (%) |
|------------|----|--------------------|--------|
| Weak pos.  | 12 | 0.04               | 11.4   |
| Pos.       | 12 | 0.16               | 2.8    |

### 10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte. It is 84.6%

### 10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is 100%.

### 10.4. Analytical sensitivity

The analytical sensitivity – defined as the apparent concentration of the analyte that can be distinguished from the zero calibrator – is 0.01 IU/ml.

### 10.5. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

|  |
|--|
| <b>Note:</b> The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. |
|--|

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. 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 immunocompromized patients and newborns serological data only have restricted value.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The 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 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. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.

- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

### 12.1. Disposal Considerations

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

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.: PCORG009      Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

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

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

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

| Spezies                            | Erkrankung | Symptome  | Infektionsmodus  |
|------------------------------------|------------|---|--|
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Diphtherie | Massives Krankheitsgefühl, feste Belege im Rachen, schmerzlos, Lymphknotenschwellung, Cäsarenhals<br><br>Komplikation: Toxin induzierte Organschäden an Nerven und Herz | Tröpfchen- oder Schmierinfektion, von Mensch zu Mensch |

Eine Infektion mit *Corynebacterium diphtheriae* kann nachgewiesen werden mittels:

- Mikroskopie: Gram-Färbung
- Serologie: Nachweis der Toxinbildung mittels ELISA

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec *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) bestimmt. Dies ermöglicht die Bestimmung des Impfstatus und die individuelle Empfehlung einer Grund- bzw. Auffrisch-Immunisierung.

## 3. TESTPRINZIP

Die quantitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischem IgG gegen *C. diphtheriae* Toxin beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit inaktiviertem *C. diphtheriae* Toxin (Toxoid) Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP) - konjugierte anti-human-IgG Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **C. diphtheriae Toxin beschichtete Mikrotiterstreifen (IgG):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit *C. diphtheriae* Toxoid Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgG-Probenverdünnungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe,
- **Stopplösung:** 1 Flasche mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **C. diphtheriae toxin anti-IgG-Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG; blau gefärbt; gebrauchsfertig, schwarze Verschlusskappe;
- **TMB-Substratlösung:** 1 Flasche mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.

- **C. diphtheriae toxin 5S IgG Zusatzkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; orange Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **C. diphtheriae IgG Standards\*\*\*:** 5 Fläschchen, je 2 ml, gebrauchsfertig:
 

|             |       |                              |
|-------------|-------|------------------------------|
| Standard A: | 0.000 | IU/ml; blaue Verschlusskappe |
| Standard B: | 0.015 | IU/ml; grüne Verschlusskappe |
| Standard C: | 0.075 | IU/ml; gelbe Verschlusskappe |
| Standard D: | 0.150 | IU/ml; rote Verschlusskappe  |
| Standard E: | 1.000 | IU/ml; weiße Verschlusskappe |

\* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

\*\* enthält 0.2 % Bronidox L

\*\*\* enthält 0.1 % Kathon

#### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

#### 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

### 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

### 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur(20...25°C) zu bringen!*

#### 6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem C. diphtheriae Toxoid Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

#### 6.2. C. diphtheriae toxin anti-IgG Konjugat

Das Fläschchen enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgG-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.3. Zusatzkontrolle

Das Fläschchen mit Zusatzkontrolle enthält eine gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die Konzentration in IU/ml ist auf dem Etikett angegeben. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren und enthält 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

#### 6.4. Standards

Die Fläschchen mit Nullstandard A und Standards B, C, D und E enthalten 2,0 ml gebrauchsfertige Standardlösung. Die Konzentrationen der Standards, gegen den „International Standard for Diphtheria Antitoxin (00/496)“ standardisiert, sind:

|             |       |       |
|-------------|-------|-------|
| Standard A: | 0.000 | IU/ml |
| Standard B: | 0.015 | IU/ml |
| Standard C: | 0.075 | IU/ml |
| Standard D: | 0.150 | IU/ml |
| Standard E: | 1.000 | IU/ml |

Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 6.5. IgG-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 6.6. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der frische Puffer ist mindestens 4 Wochen bei 2...8°C haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 6.7. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

## 6.8. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2-8 C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

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

### 7.1. Probenverdünnung

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

Proben mit erwarteten Antitoxinkonzentration oberhalb der Konzentration von Standard E (1.0 IU/ml) sollten nach der oben beschriebenen Verdünnung 1+1 weiter verdünnt werden, z.B. 100µl der ersten Probenverdünnung + 100µl IgG-Probenverdünnungspuffer (Verdünnungsfaktor: 2).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

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

Hierbei mindestens

|                |                    |                                    |
|----------------|--------------------|------------------------------------|
| 1 Vertiefung   | (z.B. A1)          | für den Substratleerwert (Blank),  |
| 5 Vertiefungen | (z.B. B1, C1, etc) | für die Standards A, B, C, D und E |
| 1 Vertiefung   | (z.B. G1)          | für die Zusatzkontrolle.           |

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Standards und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen. Es wird empfohlen positive bzw. negative Kontrollproben bei jeder Testdurchführung mitzuführen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Standard A, B, C, D und E, Zusatzkontrolle 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°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

*Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

5. 100µl C. diphtheriae anti-IgG Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
10. In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.  
*Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe wie unter 7.1. beschrieben weiter zu verdünnen und den Test zu wiederholen.*
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

## 8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

*Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!*

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der vier Standards und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

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

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

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

---

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

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

- |                            |        |  |
|----------------------------|--------|--|
| ▪ <b>Substrat-Leerwert</b> | in A1: | Extinktion < <b>0,100</b>  |
| ▪ <b>Standard A</b>        | in B1: | Extinktion < <b>0,200</b>  |
| ▪ <b>Standard B</b>        | in C1: | Extinktion > <b>0,050</b>  |
| ▪ <b>Standard C</b>        | in D1: | Extinktion > <b>0,200</b>  |
| ▪ <b>Standard D</b>        | in E1: | Extinktion > <b>0,400</b>  |
| ▪ <b>Standard E</b>        | in F1: | Extinktion > <b>1,000</b>  |
| ▪ <b>Zusatzkontrolle</b>   | in G1: | 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.

### 9.2. Messwertberechnung

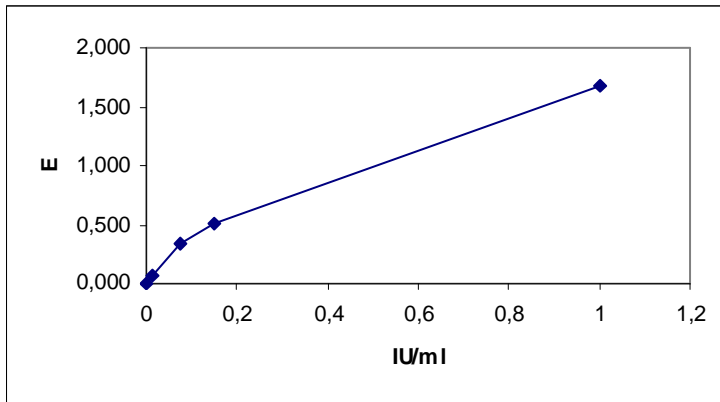
Um **quantitative Ergebnisse in IU/ml** zu erhalten, die Extinktionswerte der vier Standards A, B, C, D und E gegen ihre entsprechende Konzentration (0.000, 0.015, 0.075, 0.150, 1.0 IU/ml) auftragen und eine Standardkurve erstellen (Extinktionswerte auf der vertikalen y-Achse; Konzentrationen auf der horizontalen x-Achse).

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

*Bemerkung: Ergebnisse zusätzlich (z.B. 1+1) verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden! ( Verdünnung 1+1; Verdünnungsfaktor: 2)*

Im Handel erhältliche Auswertungsprogramme ermöglichen eine automatische Erstellung der Standardkurve und Kalkulation der Ergebnisse.

### 9.2.1 Typische Standardkurve



### 9.3. Interpretation der Ergebnisse und Empfehlungen [IU/ml]\*

|             |   |
|-------------|---|
| <0,01       | Kein protektiver Antikörperspiegel!<br>Grundimmunisierung empfohlen.  |
| 0,01 – 0,09 | Kein verlässlicher Schutz vor Infektion!<br>Auffrischungsimpfung und Kontrolle der Antikörperspiegel nach 4-6 Wochen empfohlen. |
| 0,10 – 1,0  | Verlässlicher Schutz vor Infektion!   |
| >1,0        | Verlässlicher Langzeit-Schutz!  |

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.

\*In Anlehnung an: RKI 1999

## 10. TESTMERKMALE

### 10.1. Präzision

| Intraassay   | n  | Mittelwert (OD) | Vk (%) |
|--------------|----|-----------------|--------|
| Schwach pos. | 24 | 0.95            | 12.1   |
| Pos.         | 24 | 3.02            | 2.1    |

| Interassay   | n  | Mittelwert (IU/ml) | Vk (%) |
|--------------|----|--------------------|--------|
| Schwach pos. | 12 | 0.04               | 11.4   |
| Pos.         | 12 | 0.16               | 2.8    |

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 84,6%.

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 100%.

### 10.4. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Tests ist definiert als die kleinste Konzentration, die vom Nullstandard unterschieden werden kann. Sie beträgt 0.01 IU/ml.

### 10.5. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

---

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

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 der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

---

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung 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 verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- 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.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>WARNUNG:</b> | Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut. |
|-----------------|--|

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>WARNUNG:</b> | Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen. |
|-----------------|--|

### 12.1. Entsorgungshinweise

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

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

---

Produktnummer: PCORG009      Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus ELISA (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUZIONE

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

| Specie                             | Malattia  | Sintomi   | Modo d'infezione  |
|------------------------------------|-----------|---|---|
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Difterite | Malessere generale, gonfiore della gola e dei linfonodi<br><br>Complicanze: danni su altri organi causati dalla tossina | Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta |

### Diagnosi

- Microscopia: colorazione di Gram
- Sierologia: ELISA

## 2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Corynebacterium diphtheriae* tossina 5S IgG plus ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli anticorpi specifici della classe IgG per la tossina del *Corynebacterium diphtheriae* nel siero o plasma (citrato) umano. Si determina lo stato dell'immunità e verifica la necessità di ulteriori immunizzazioni.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione quantitativa degli anticorpi IgG per la tossina del *Corynebacterium diphtheriae* si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con la tossina inattivata del *Corynebacterium diphtheriae* (antigeni). Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgG umane) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il *Corynebacterium diphtheriae* di classe IgG presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

## 4. MATERIALI

### 4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con la tossina del *Corynebacterium diphtheriae* (IgG):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi la tossina del *Corynebacterium diphtheriae*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgG\*\*\*:** 1 flacone contenente 100 ml di diluente per campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):\*** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Corynebacterium diphtheriae* tossina anti IgG\*\*:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi anti-IgG umane, coniugati a perossidasi; color azzurro; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- ***Corynebacterium diphtheriae* tossina 5S IgG Controllo\*\*\*:** 1 flacone da 2 ml; colore giallo; pronto uso; tappo arancio
- ***Corynebacterium diphtheriae* tossina IgG Standards\*\*\*:** 5 flaconi, contenenti 2 ml, pronti all'uso:  
Standard A: 0.000 IU/ml; tappo blu  
Standard B: 0.015 IU/ml; tappo verde  
Standard C: 0.075 IU/ml; tappo giallo  
Standard D: 0.150 IU/ml; tappo rosso  
Standard E: 1.000 IU/ml; tappo bianco

- \* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione
- \*\* contiene 0.2 % Bronidox L
- \*\*\* contiene 0.1 % Kathon

## 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

## 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

## 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

## 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!*

### 6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesi la tossina inattivata del *Corynebacterium diphtheriae*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.2. Coniugato *Corynebacterium diphtheriae* tossina IgG

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgG umane coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte azzurro. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.3. Controllo

Il flacone contiene una soluzione di controllo pronto uso. La concentrazione in IU/ml è riportata sull'etichetta. Contiene 0.1% Kathon e deve essere conservato a 2...8°C. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato a 2...8°C.*

### 6.4. Standards

I flaconi contengono 2.0 ml di soluzione Standard pronta all'uso con le seguenti concentrazioni (La concentrazione degli standards si riferiscono al "International Standard for Diphtheria Antitoxin (00/496)"):

|             |       |       |
|-------------|-------|-------|
| Standard A: | 0.000 | IU/ml |
| Standard B: | 0.015 | IU/ml |
| Standard C: | 0.075 | IU/ml |
| Standard D: | 0.150 | IU/ml |
| Standard E: | 1.000 | IU/ml |

Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.5. Tampone diluente IgG

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.6. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.7. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 6.8. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Usare campioni di siero o plasma (cittrato) umano. Se il test viene 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. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

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

### 7.1. Diluizione dei campioni

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

Per pazienti con probabili concentrazioni superiori allo Standard E (1.0 IU/ml) i campioni devono essere ulteriormente diluiti dopo la diluizione descritta sopra 1+1. Es. 100µl della prima diluizione + 100µl tampone diluente IgG (Fattore di diluizione: 2).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

|            |                    |                                  |
|------------|--------------------|----------------------------------|
| 1 pozzetto | (es. A1)           | per il bianco-substrato (blank)  |
| 5 pozzetti | (z.B. B1, C1, etc) | per gli Standards A, B, C, D e E |
| 1 pozzetto | (es. G1)           | per controllo                    |

*È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.*

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

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard.

Regolare l'incubatore a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl degli standards A, B, C, D, E, controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

*Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100µl di Coniugato *Corynebacterium diphtheriae* tossina anti-IgG in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ).** *Non esporre a fonti di luce diretta.*
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}$ ... $25^{\circ}\text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

*Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni un'altra volta come descritto in 7.1 e di ripetere il test.*

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

## 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a **zero** usando il substrato-bianco (blank) in **A1**. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

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

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Assorbanza < **0,100**
- **Standard A** in B1: Assorbanza < **0,200**
- **Standard B** in C1: Assorbanza > **0,050**
- **Standard C** in D1: Assorbanza > **0,200**
- **Standard D** in E1: Assorbanza > **0,400**
- **Standard E** in F1: Assorbanza > **1,000**
- **Controllo** in G1: risultato in IU/ml entro il range indicato sull'etichetta

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

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

### 9.2. Calcolo dei risultati

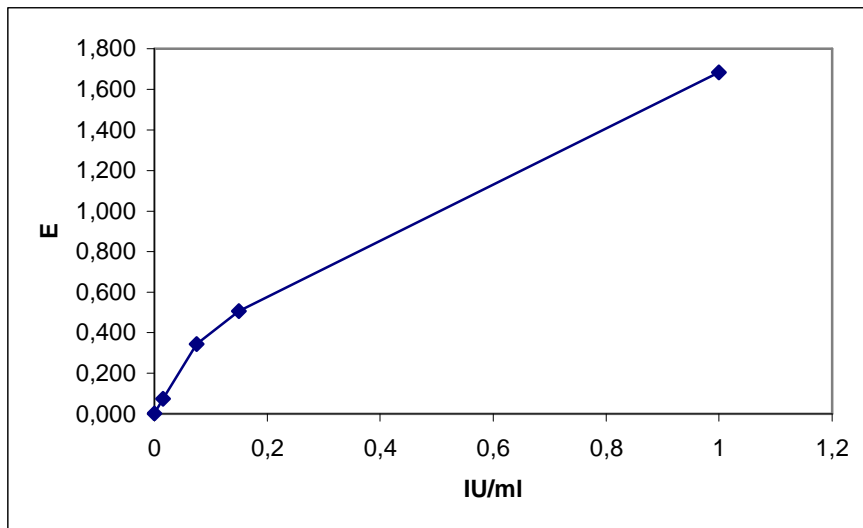
Per ottenere i **risultati quantitativi in IU/ml**, realizzare un diagramma cartesiano ponendo le assorbanze degli Standards A, B, C, D e E sull'asse della Y e ponendo le concentrazioni (0,0, 0,015, 0,075, 0,150, 1,0 IU/ml) sull'asse della X su cui tracciare la curva standard.

Traendo i risultati da questa curva standard vanno inseriti i valori medi delle assorbanze dei campioni di ogni singolo paziente.

Attenzione: I risultati dei campioni diluiti due volte devono essere moltiplicati con il fattore di diluizione!  
(Diluizione 1+1; fattore di diluizione: 2)

Tutti i programmi per computer commercializzati sono utilizzabili per calcolare ed interpretare i risultati.

#### 9.2.1 Tipica curva standard



### 9.3. Interpretazione dei risultati e raccomandazioni [IU/ml]\*

|             |  |
|-------------|--|
| <0.01       | Nessuna protezione; mancanza di anticorpi!<br>L'immunizzazione é raccomandata.   |
| 0.01 – 0.09 | La protezione da infezioni non é assicurata!<br>Una ripetizione dell'immunizzazione e il controllo dopo 4-6 settimane sono raccomandati. |
| 0.10 – 1.0  | Protezione piú o meno sicura da infezioni!<br>Una ripetizione dell'immunizzazione e il controllo dopo 4-6 settimane sono raccomandati.   |
| >1.0        | Protezione sicura da infezioni!  |

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.

\* in accordo con: RKI 1999

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

### 10.1. Precisione

| Interdosaggio   | n  | Media (IU/ml) | Cv (%) |
|-----------------|----|---------------|--------|
| Lievemente pos. | 24 | 0.95          | 12.1   |
| Pos.            | 24 | 3.02          | 2.1    |

| Intradossaggio  | n  | Media (OD) | CV (%) |
|-----------------|----|------------|--------|
| Lievemente pos. | 12 | 0.04       | 11.4   |
| Pos.            | 12 | 0.16       | 2.8    |

### 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a 84.6%.

### 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a 100%.

### 10.4. Sensitività analitica

La sensitività analitica del test é definita dalla concentrazione piú piccola che può essere distinta dallo standard A. Essa equivale a 0.01 IU/ml.

### 10.5. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

## 11. LIMITAZIONI

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

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.

- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- 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.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

**ATTENZIONE:** Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

**ATTENZIONE:** L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto: PCORG009      Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus-ELISA (96 determinazioni)





## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

---

BGA, Impfempfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Bundesgesundheitsamtes vom 22.2.1994, Bundesgesundheitsblatt 8/94






CDC, International Notes (1993): Diphtheria Outbreak-Russian Federation, 1990-1993: Morbidity and Mortality Weekly Report 42:840

Hofmann, F., F. Schuh, M. Michaelis, U. Stöbel (1994): Zur Akzeptanz von Schutzimpfungen bei Ärzten und bei der Allgemeinbevölkerung, Ges. Wes. 56, 371-376

WHO (7.5.1993): Expanded Programme on Immunization-Outbreak of diphtheria, update Wkly Epid Rec No. 19, 134-138

WHO (26.8.1994): Expanded Programme on Immunization-Diphtheria Epidemic. Wkly Epid Rec Nr. 34

RKI (1999) Populationsimmunität gegen Diphtherie und Pertussis. Epidemiologisches Bulletin 1/99, 1-4

| Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos/ Tabela de símbolos |  |
|---|--|
|                | Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por/ Fabricado por   |
| <b>IVD</b>  | In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro/ Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro |
| <b>LOT</b>  | Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote/ Número do 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  |
| <b>CE</b>   | CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ MarcaCE/ Marca CE   |
| <b>REF</b>  | Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo/ Referência de Catálogo   |
|                | Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso/ Consultar as Instruções de Utilização                             |
| <b>MTP</b>  | Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca/ Microplaca  |
| <b>CONJ</b>   | Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado/ Conjugado   |
| <b>CAL</b>   <b>A - E</b>   | Calibrator A-E/ Kalibrator A-E/ Etalon A-E/ Calibratore A-E/ Calibrador A-E  |
| <b>control</b>   <b>ADD</b>   | Additional Control/ Zusatzkontrolle/ Controllo   |
| <b>DIL</b>   <b>G</b>   | Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgG/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG/ Solução de tampão IgG para amostras                    |
| <b>SOLN</b>   <b>STOP</b>   | Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante/ Solución de parada/ Solução de bloqueio  |
| <b>SUB</b>   <b>TMB</b>   | TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB/ Solução substrato TMB   |
| <b>WASH</b>   <b>BUF</b>   <b>20x</b>   | Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20/ Solução de lavagem concentrado 20x         |
|              | Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests/ Conteúdo suficiente para "n" testes                |

# SCHEME OF THE ASSAY

Corynebacterium diphtheriae toxin 5S IgG plus-ELISA

## Assay Preparation

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

## Assay Procedure

|  | Substrate blank<br>(z.B. A1) | Std A | Std B | Std C | Std D | Std E  | Add. control | Sample<br>(diluted 1+100) |
|--|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------------|---------------------------|
| Standard A   | -                            | 100µl | -     | -     | -     | -      | -            | -                         |
| Standard B   | -                            | -     | 100µl | -     | -     | -      | -            | -                         |
| Standard C   | -                            | -     | -     | 100µl | -     | -      | -            | -                         |
| Standard D   | -                            | -     | -     | -     | 100µl | -      | -            | -                         |
| Standard E   | -                            | -     | -     | -     | -     | 100 µl | -            | -                         |
| Add. control   | -                            | -     | -     | -     | -     | -      | 100µl        | -                         |
| Sample<br>(diluted 1+100)  | -                            | -     | -     | -     | -     | -      | -            | 100µl                     |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 1 h at 37°C</b><br>Wash each well three times with 300µl of washing solution                |                              |       |       |       |       |        |              |                           |
| Conjugate  | -                            | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100 µl | 100µl        | 100µl                     |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 30 min at room temperature</b><br>Wash each well three times with 300µl of washing solution |                              |       |       |       |       |        |              |                           |
| TMB Substrate  | 100µl                        | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl | 100 µl | 100µl        | 100µl                     |
| <b>Incubate for 15 min at room temperature in the dark</b>   |                              |       |       |       |       |        |              |                           |
| Stop Solution  | 100µl                        | 100µl | 100µl | 100µl | 100µl |        | 100µl        | 100µl                     |
| Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)   |                              |       |       |       |       |        |              |                           |

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

### Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6

D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: [www.NovaTec-ID.com](http://www.NovaTec-ID.com)

PCORG009engl,dt,it05032010-CR