

NovaLisa[®]

Dengue Virus IgM μ -capture

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Instrucciones de uso / Instruções de utilização

English	2
Deutsch	7
Español	12
Português	17
Abbreviations / Abkürzungen / Abreviaciones / Abreviaturas	22
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem	22
Symbols Key / Symbolschlüssel / Símbolos / Tabela de símbolos	23
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	24

REF

DVM0640 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The Dengue Virus IgM μ -capture ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Dengue virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific IgM-class antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) μ -capture technique.

Microtiterplates are coated with anti-human IgM to bind the corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material, a mixture of antigen and horseradish peroxidase (HRP) labelled antibody is added. This mixture binds to the captured specific IgM antibodies. In a second washing step unbound antigen and antibody are removed. The immune complexes are visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific IgM 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 anti-human IgM-class antibodies; in resealable aluminium foil.
- **DIL:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 \pm 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap; \leq 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 \pm 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Antigen, lyophilized:** 6 bottles containing lyophilized Dengue virus antigen; red cap; \leq 0.02% (v/v) MIT.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 15 mL of peroxidase labelled antibody to Dengue virus; coloured red; black cap.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; \leq 0.02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; \leq 0.02% (v/v) MIT.
- **Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; \leq 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

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 μ L
- 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 anti-human IgM-class antibodies. 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.

5.4. **Antigen, lyophilized**

The bottles contain Antigen, lyophilized. The content of each vial has to be resolved in 2 mL Conjugate Solution by turning it slowly (no vortex) and 15 min incubation at room temperature (20...25 °C). This Antigen Conjugate Solution is stable for 3 hours at room temperature (20...25 °C).

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 60 min ± 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 Antigen Conjugate Solution into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at 37 ± 1 °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 value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

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

8.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

8.2.1. Results in Units [NTU]

Sample (mean) absorbance value x 10 / Cut-off = [NovaTec Units = NTU]

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 NTU	-
Positive	> 11 NTU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 NTU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks.
Negative	< 9 NTU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
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.		

8.3.1. Antigen, Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
Antigen	Characteristic of an acute infection
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

No samples from vaccinated persons have been tested.

9.1. Precision

Intraassay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	23	0.530	3.23
#2	24	1.019	2.44
#3	24	0.986	2.75
Interassay	n	Mean (NTU)	CV (%)
#1	12	18.77	6.60
#2	12	8.96	6.16
#3	12	5.32	5.79

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 99.0 % (95 % confidence interval: 94.55 – 99.97 %).

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: 93.40 % - 100 %).

9.4. 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.

9.5. Cross Reactivity

Cross reactions with antibodies to West Nile Virus, Zika Virus and with rheumatoid factor positive specimens cannot be excluded. In general, cross-reactivity with other flaviviruses is possible and should be taken into account for result interpretation. It is recommended to confirm positive results with a second method.

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

DVM0640

Dengue Virus IgM μ -capture (96 Determinations)

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Dengue Virus IgM μ -capture ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Dengue Virus in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgM-Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) μ -capture Technik.

Mikrotiterplatten sind mit anti-human IgM Antikörpern beschichtet, um entsprechende Antikörper aus der Probe zu binden. Ungebundenes Probenmaterial wird durch den folgenden Waschschrift entfernt. Anschließend wird eine Mischung aus Antigen und Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiertem Antikörper zugegeben. Diese Mischung bindet an immobilisierte spezifische IgM-Antikörper. In einem zweiten Waschschrift werden ungebundenes Antigen und Antikörper entfernt. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Die Intensität dieses Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen IgM-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 anti-human IgM-Antikörpern; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL:** 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH 7,2 \pm 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; \leq 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 \pm 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Antigen, lyophilisiert:** 6 Fläschchen mit lyophilisiertem Dengue Virus Antigen, rote Verschlusskappe; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 15 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen Dengue Virus; rot gefärbt; schwarze Verschlusskappe.
- **SUB TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), $<$ 0,1 %; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Positivkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Cut-off Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Negativkontrolle:** 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig; \leq 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

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 Wascheinrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10 - 1000 μ L)
- 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 anti-human IgM Antikörpern 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.

5.4. **Antigen, lyophilisiert**

Die Fläschchen enthalten Antigen, lyophilisiert. Der Inhalt jedes Fläschchens wird mit 2 mL Konjugat unter Schwenken (kein Vortex) gelöst und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubiert. Die gebrauchsfertige Antigen-Konjugat Lösung ist 3 Stunden bei Raumtemperatur (20...25 °C) haltbar.

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. **60 min ± 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 Antigen-Konjugat Lösung in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei 37 ± 1 °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**
- **Negativkontrolle:** Extinktionswert < **Cut-off**
- **Cut-off Kontrolle:** Extinktionswert **0,150 – 1,300**
- **Positivkontrolle:** Extinktionswert > **Cut-off**

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

8.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Cut-off Kontrolle.

Beispiel: 0,44 OD Cut-off Kontrolle + 0,42 OD Cut-off Kontrolle = 0,86 : 2 = 0,43

Cut-off = 0,43

8.2.1. Ergebnisse in Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Probe} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 NTU	-
Positiv	> 11 NTU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 NTU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen.
Negativ	< 9 NTU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

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.

8.3.1. Antigen, Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
Antigen	Typisch für eine akute Infektion
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen. Es wurden keine Proben von geimpften Personen getestet.

9.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	23	0,530	3,23
#2	24	1,019	2,44
#3	24	0,986	2,75

Interassay	n	Mittelwert (NTU)	Vk (%)
#1	12	18,77	6,60
#2	12	8,96	6,16
#3	12	5,32	5,79

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 99,0 % (95 % Konfidenzintervall: 94,55 – 99,97 %).

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: 93,40 % - 100 %).

9.4. 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.

9.5. Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen West-Nil-Virus, Zikavirus und mit Rheumafaktor-positiven Proben können nicht ausgeschlossen werden.

Generell ist eine Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren möglich und sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es wird empfohlen, positive Ergebnisse mit einer zweiten Methode zu bestätigen.

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

DVM0640

Dengue Virus IgM μ -capture

(96 Bestimmungen)

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzimático Dengue Virus IgM μ -capture IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Dengue Virus en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos IgM se basa en la técnica μ -capture ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con anticuerpos de clase IgM anti-humano para unirse a anticuerpos correspondientes en la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar cualquier material de la muestra no unido, se añade el antígeno y un anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano (HRP). Esta mezcla se une a los anticuerpos específicos IgM capturados. En una segunda etapa de lavado se retira antígeno y anticuerpo no unido. Los complejos inmunes formados se visualizan añadiendo sustrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos IgM 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 Placas de Microtitulación ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con anticuerpos de la clase IgM anti-humanos, 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 \pm 0,2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca; \leq 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 \pm 0,2; tapa blanca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Antígeno, liofilizado:** 6 botellas que contienen antígeno Dengue Virus liofilizado; tapa roja; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Conjugado:** 1 botella de 15 mL de conjugado de anticuerpos Dengue Virus con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; 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 Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; \leq 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

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 para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ L)
- 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 anticuerpos de la clase IgM anti-humanos. 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.

5.4. Antígeno, liofilizado

Los frascos contienen antígeno liofilizado. El contenido de cada vial se tiene que preparar en 2 mL de solución de conjugado, agitandola lentamente (no utilices vórtex) e incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20...25 °C). Esta solución Antígeno Conjugado es estable durante 3 horas a la temperatura ambiente (20...25 °C).

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 60 min ± 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 antes del siguiente paso.
Nota: ¡El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetar 100 µL de la solución antígeno-conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a 37 ± 1 °C.** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetar 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
- **Control Negativo :** valor de la extinción < **Cut-off**
- **Control Cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control Positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

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

8.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos Controles Cut-off.

Ejemplo: $0,42 \text{ OD Control Cut-off} + 0,44 \text{ OD Control Cut-off} = 0,86 : 2 = 0,43$
Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados en unidades [NTU]

$\frac{\text{Promedio valor de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{NovaTec-unidades} = \text{NTU}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$

8.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 NTU	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas.
Negativo	< 9 NTU	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.

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.

8.3.1. Antígeno, isotipos de anticuerpos y estado de la infección

Serología	Significado
Antígeno	Característica de una infección aguda
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundaria del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas. No se han probado muestras de personas vacunadas.

9.1. Precisión

<u>Intra ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio (E)</u>	<u>CV (%)</u>
#1	23	0,530	3,23
#2	24	1,019	2,44
#3	24	0,986	2,75
<u>Inter ensayo</u>	<u>n</u>	<u>Promedio (NTU)</u>	<u>CV (%)</u>
#1	12	18,77	6,60
#2	12	8,96	6,16
#3	12	5,32	5,79

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 99,0% (95% Intervalo de confianza: 94,55 - 99,97%).

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: 93,40% - 100%).

9.4. 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.

9.5. Reactividad cruzada

No se pueden excluir reacciones cruzadas con anticuerpos contra el virus del Nilo Occidental, el virus del Zika y con muestras positivas para el factor reumatoide.

En general, la reactividad cruzada con otros flavivirus es posible y debe tenerse en cuenta para la interpretación de los resultados. Se recomienda confirmar los resultados positivos con un segundo método.

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 diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humana o animal deberam 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 Plaquas de Microtitrage 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	DVM0640	Dengue Virus IgM μ -capture	(96 determinaciones)
------------	---------	---------------------------------	----------------------

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit Dengue Virus IgM μ -capture ELISA destina-se à determinação qualitativa de anticorpos da classe IgM contra Dengue Virus no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática qualitativa de anticorpos específicos de la clase IgM é baseado na técnica μ -capture de ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As Placas de Microtitulação são revestidas com IgM anti-humain para que se liguem aos anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, para remover todo o material de amostra não ligado, uma mistura de antígeno com anticorpos conjugado com peroxidase de rábano (HRP) é adicionada. Esta mistura liga-se aos anticorpos IgM específicos capturados. Em um segundo passo de lavagem, o antígeno e anticorpo não ligado são removidos. Os complexos imunes são visualizados pela adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), o que dá um produto de reação azul. A intensidade deste produto é proporcional à quantidade de anticorpos IgM específicos da amostra. O ácido sulfúrico é adicionado para parar a reação. Isso produz uma mudança de cor de azul para amarelo. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotômetro de Placa de Microtitulação ELISA.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com anticorpos da classe IgM anti-humano, 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 \pm 0,2; de cor amarela; pronto a usar; tampa branca; \leq 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 \pm 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Antígeno, liofilizado:** 6 frascos que contendo antígeno Dengue Virus liofilizada; tampa vermelha; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 15 mL de peroxidase conjugada com anticorpos do vírus da Dengue; de cor vermelha, tampa preta.
- **SUB TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), $<$ 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle Positivo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa vermelha. \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Cut-off:** 1 frasco contendo 3 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa verde; \leq 0,02% (v/v) MIT.
- **Controle Negativo:** 1 frasco contendo 2 mL controle; de cor amarela; pronto a usar; tampa azul; \leq 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 11.1.

3.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de utilização

3.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotômetro 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 μ L
- 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 com anticorpos da classe IgM anti-humano. 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.

5.4. Antigenio, liofilizado

Os frascos contêm um Antigenio liofilizado. O conteúdo de cada frasco deve ser dissolvido em 2 mL de solução de conjugado, agitando-a lentamente e cuidadosamente (não utilizar vórtex) e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (20...25 °C). Esta solução Antigenio Conjugado é estável durante 3 horas à temperatura ambiente (20...25 °C).

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 inativação 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 ao as 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 60 min ± 5 min à 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 solução Antigenio-Conjugado em todos os poços, excepto no poço do Branco substrato A1.
6. **Incubar durante 30 min à 37 ± 1 °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 à 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:

- **Branco substrato:** Valor de Absorvância < 0,100
- **Controle Negativo:** Valor de Absorvância < **Cut-off**
- **Controle Cut-off:** Valor de Absorvância 0,150 – 1,300
- **Controle Positivo:** Valor de Absorvância > **Cut-off**

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

8.2. Cálculo dos Resultados

O Cut-off é o valor médio da absorvância das determinações do Controle Cut-off.

Exemplo: Valor da absorvância do Controle Cut-off 0,42 + valor da absorvância do Controle Cut-off 0,44 = 0,86: 2 = 0,43
Cut-off = 0,43

8.2.1. Resultados em Unidades [NTU]

$$\frac{\text{Valor da absorvância (média) da amostra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Unidades NovaTec} = \text{NTU}]$$

Exemplo:
$$\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ NTU}$$

8.3. Interpretação dos Resultados

Cut-off	10 NTU	-
Positivo	> 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico estão presente. Houve um contacto com o antígeno (patógeno resp vacina).
Zona cinzenta	9 – 11 NTU	Os anticorpos contra o agente patogênico não puderam ser claramente detectados. Recomenda-se a repetir o teste com uma amostra fresca em 2 a 4 semanas.
Negativo	< 9 NTU	A amostra não contém os anticorpos contra o agente patogênico. Um contato prévio com o antígeno (patógeno resp. vacina) é improvável.

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.

8.3.1. Antígeno, isotipos de anticorpos, e estado da infecção

Sorologia	Significado
Antígeno	Característico de uma infecção aguda
IgM	Característica da resposta primária do anticorpo Alto título de IgM com baixo título de IgG: → sugere uma infecção muito recente ou aguda Raros: → persistente IgM
IgG	Característica da resposta secundária do anticorpo Podem persistir por vários anos Alto título de IgG com baixo título de IgM: → pode indicar uma infecção passada

9. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

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

Não foram testados amostras de pessoas vacinadas

9.1. Precisão

Intra-ensaio	n	Média (E)	CV(%)
# 1	23	0,530	3,23
# 2	24	1,019	2,44
# 3	24	0,986	2,75
Inter-ensaio	n	Média (NTU)	CV(%)
# 1	12	18,77	6,60
# 2	12	8,96	6,16
# 3	12	5,32	5,79

9.2. Especificidade Diagnóstica

A especificidade diagnóstica é definida como a probabilidade do ensaio ser negativo na ausência do analito específico. É de 99,0 % (95 % Intervalo de confiança: 94,55 - 99,97 %).

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: 93,40 % - 100 %).

9.4. Interferências

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

9.5. Reacção cruzada

Não podem ser excluídas reações cruzadas com anticorpos contra o vírus do Nilo Ocidental, vírus Zika e com espécimes positivos para fator reumatoide.

Em geral, a reatividade cruzada com outros flavivírus é possível e deve ser levada em conta para a interpretação dos resultados. Recomenda-se confirmar resultados positivos com um segundo método.

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 juntar reagentes ou Placas 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 utilizá-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

DVM0640


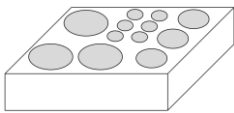







Dengue Virus IgM μ -capture

(96 Determinações)






ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

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

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22																
<table border="1"> <tr> <td>SOLN</td> <td>STOP</td> <td>WASH</td> <td>BUF</td> <td>20x</td> <td>SUB</td> <td>TMB</td> <td>DIL</td> </tr> <tr> <td>CONJ</td> <td>CONTROL +</td> <td>CONTROL -</td> <td colspan="5">CUT OFF</td> </tr> </table>		SOLN	STOP	WASH	BUF	20x	SUB	TMB	DIL	CONJ	CONTROL +	CONTROL -	CUT OFF					MTP
SOLN	STOP	WASH	BUF	20x	SUB	TMB	DIL											
CONJ	CONTROL +	CONTROL -	CUT OFF															
 HDPE 2	 PP 5	 PET / ALU / LDPE 90																
AG LYO																		
 GL 70	 PP 5	 Chlorobutyl																

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / SÍMBOLOS / TABELA DE SÍMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabricado por / Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
CE	CE marking / CE-Kennzeichnung / Marca CE / Marca CE
UDI	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos
REF	Catalogue Number / Katalog Nummer / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
MTP	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Placa de Microtitulaci3n / Placa de Microtitula3o
CONJ	Conjugate / Konjugat / Conjugado / Conjugado
CONTROL -	Negative Control / Negativkontrolle / Control Negativo / Controle Negativo
CONTROL +	Positive Control / Positivkontrolle / Control Positivo / Controle Positivo
CUT OFF	Cut-off Control / Cut-off Kontrolle / Control Cut-off / Controle Cut-off
AG LYO	Antigen, lyophilized / Antigen, lyophilisiert / Antígeno, liofilizado / Antigenio, liofilizado
DIL	Sample Dilution Buffer / Probenverdünnungspuffer / Tamp3n de Diluci3n de Muestras / Tamp3o de Dilui3o de Amostra
SOLN STOP	Stop Solution / Stoppl3sung / Soluci3n de Parada / Solu3o de Bloqueio
SUB TMB	TMB Substrate Solution / TMB-Substratl3sung / Soluci3n Substrato TMB / Solu3o Substrato TMB
WASH BUF 20x	“Washing Buffer (20x concentrated)”; REF W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampone di Lavaggio concentrado x20 / Tamp3o de Lavagem concentrada 20x
WASH BUF 1x	20-fold dilution of WASH BUF 20x / 20-fach Verdünnung von WASH BUF 20x / Diluci3n de 20 veces del WASH BUF 20x / Dilui3o de 20 dobras do WASH BUF 20x
	Contains sufficient for “n” tests / Ausreichend für “n” Tests / Contenido suficiente para “n” tests / Conteúdo suficiente para “n” testes

SCHEME OF THE ASSAY

Dengue Virus IgM μ -capture

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)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 μ L	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 μ L	-	-
Positive Control	-	-	-	100 μ L	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 μ L
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 60 min at 37 \pm 1 $^{\circ}$C Wash each well three times with 300 μ L of WASH BUF 1x					
Antigen Conjugate Solution	-	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate for 30 min at 37 \pm 1 $^{\circ}$C Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 μ L of WASH BUF 1x					
SUB TMB	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 $^{\circ}$C) in the dark					
SOLN STOP	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
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

DVM0640_IFU_rev01_fromLot_032N