



## Instructions for Use

# TBE IgM (Tick-borne Encephalitis Virus) ELISA



**REF** EIA-3861

 96



**DRG Instruments GmbH**, Germany  
Frauenbergstraße 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)



**DRG International, Inc.**, USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
 Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
 Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.  
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.  
 Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE OF THE ASSAY .....	2
3	MATERIALS.....	2
4	STABILITY AND STORAGE .....	3
5	REAGENT PREPARATION .....	3
6	SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION.....	3
7	ASSAY PROCEDURE .....	4
8	RESULTS.....	4
9	SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	5
10	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	6
11	PRECAUTIONS AND WARNINGS .....	6
1	VERWENDUNGSZWECK.....	8
2	TESTPRINZIP .....	8
3	MATERIALIEN .....	8
4	STABILITÄT UND LAGERUNG .....	9
5	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	9
6	ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN .....	9
7	TESTDURCHFÜHRUNG .....	10
8	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	10
9	TESTMERKMALE .....	11
10	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	12
11	SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE .....	12
1	USO PREVISTO .....	14
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	14
3	MATERIALI .....	14
4	MODALITÀ DI CONSERVAZIONE .....	15
5	PREPARAZIONE DEI REAGENTI.....	15
6	PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....	15
7	PROCEDIMENTO .....	16
8	RISULTATI.....	16
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	17
10	LIMITAZIONI .....	18
11	PRECAUZIONI E AVVERTENZE.....	18
12	PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM .....	20
13	SCHEME OF THE ASSAY .....	21
	SYMBOLS USED.....	22

## 1 INTENDED USE

The TBE IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against TBE/FSME Virus in human serum or plasma (citrate, heparin).

## 2 PRINCIPLE OF THE ASSAY

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

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

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

## 3 MATERIALS

### 3.1 Reagents supplied

- **Microtiterplate:**  
12 break-apart 8-well snap-off strips coated with TBE/FSME Virus antigens; in resealable aluminium foil.
- **DIL M:**  
1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH  $7.2 \pm 0.2$ ; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; 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.
- **Conjugate:**  
1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
- **SUB TMB:**  
1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB),  $< 0.1\%$ ; ready to use; yellow cap.
- **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 Microtiterplate
- Pipettes to deliver volumes between 10  $\mu$ L and 1000  $\mu$ L
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

#### 4 STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2 °C - 8 °C.

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

#### 5 REAGENT PREPARATION

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

##### 5.1 Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with TBE/FSME Virus antigens.

Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2 °C - 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 °C - 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 °C - 8 °C, away from the light.

SUB TMB should be colourless or could have a slight blue tinge. If SUB TMB turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

#### 6 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay.

If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2 °C - 8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 °C to -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 M.

Dispense 10 µL sample and 1 mL DIL M 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 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 °C ± 1 °C.

1. Dispense 100 µL standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 °C ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of **WASH|BUF|1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!  
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 µL Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL **SUB|TMB** into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 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 < **0.200** and < **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 [DU]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{DRG Units} = \text{DU}]$$

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

## 8.3 Interpretation of Results

Cut-off	10 DU	-
Positive	> 11 DU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine). <u>After vaccination:</u> This is a case of seroconversion. Check anamnestic data and if necessary complete basic immunization or give a booster
Equivocal	9 – 11 DU	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. <u>After vaccination:</u> This may be a case of seroconversion. Continue with basic immunisation or booster. A non-specific reaction is not excluded.
Negative	< 9 DU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely. <u>After vaccination:</u> No seroconversion after vaccination. This may be the case after the first vaccination during basic immunisation. Patients who show low or no response.

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 Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
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.

### 9.1 Precision

Intra assay	n	Mean (E)	CV (%)
#1	24	0.490	8.77
#2	24	1.039	7.77
#3	24	0.917	11.74
Inter assay	n	Mean (DU)	CV (%)
#1	12	18.14	10.86
#2	12	15.99	13.26
#3	12	2.04	12.56

## 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 98.29% (95% confidence interval: 95.07% - 99.65%).

## 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: 69.15% - 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 reactivity with other flaviviruses cannot be excluded and should be taken into account for result interpretation.

## 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 test kits 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 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

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 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

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.



## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der TBE IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen TBE/FSME in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

## 2 TESTPRINZIP

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

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

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

## 3 MATERIALIEN

### 3.1 Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:**  
12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit TBE/FSME Virus Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **DIL M:**  
1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10 mM) zur Probenverdünnung; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; anti-human IgG (RF- Absorbens); grün 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.
- **Konjugat:**  
1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10 mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; 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 Waschorruchtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (10  $\mu$ L - 1000  $\mu$ L)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

#### 4 STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2 °C - 8 °C lagern.

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

#### 5 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

##### 5.1 Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit TBE/FSME Virus Antigenen beschichtet.

Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2 °C - 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 °C - 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 °C - 8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren.

**SUB | TMB** ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die **SUB | TMB** blau sein, ist es kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

#### 6 ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

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

Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2 °C - 8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70 °C bis -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 | M** verdünnen, z. B. 10 µL Probe und 1 mL **DIL | M** in die entsprechenden Röhrchen 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 Waschschritte von drei auf fünf und das **WASH|BUF|1x**-Volumen von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

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

Den Inkubator auf 37 °C ± 1 °C einstellen.

1. Je 100 µL Standards/Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37 °C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL **WASH|BUF|1x** waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.  
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
5. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL **SUB|TMB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 °C - 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 < **0,200** und < **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:  $0,44 \text{ OD Cut-off-Kontrolle} + 0,42 \text{ OD Cut-off-Kontrolle} = 0,86 / 2 = 0,43$

Cut-off = 0,43

### 8.2.1 Ergebnisse in Einheiten [DU]

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

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

## 8.3 Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 DU	-
Positiv	> 11 DU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden. <u>Nach Impfungen</u> Serokonversion nach Impfung Impfdaten prüfen, wenn nötig Grundimmunisierung vervollständigen bzw. auffrischen.
Grenzwertig	9 – 11 DU	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. <u>Nach Impfungen</u> mögliche Serokonversion nach Impfung mit der Grundimmunisierung fortfahren bzw. auffrischen unspezifische Reaktionen sind nicht ausgeschlossen
Negativ	< 9 DU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich. <u>Nach Impfungen</u> möglich nach der ersten Teilimpfung bei Grundimmunisierung Patienten mit langsamer oder fehlender Impfantwort

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 Antikörper-Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
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.

### 9.1 Präzision

Intra-Assay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
#1	24	0,490	8,77
#2	24	1,039	7,77
#3	24	0,917	11,74
Inter-Assay	n	Mittelwert (DU)	Vk (%)
#1	12	18,14	10,86
#2	12	15,99	13,26
#3	12	2,04	12,56

### 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 98,29 % (95% Konfidenzintervall: 95,07 % - 99,65 %).

### 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: 69,15 % - 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 anderen Flaviviren können nicht ausgeschlossen werden und sollten bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

## 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 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

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 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

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.

## 1 USO PREVISTO

Il TBE IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM del TBE/FSME virus nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

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

Piastre di Microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Dopo aver lavato i pozzetti per rimuovere tutto il materiale campione non legato, il coniugato di perossidasi di rafano (HRP) è aggiunto. Questo coniugato si lega agli anticorpi catturati. In una seconda fase di lavaggio coniugato, non legato è rimosso. Il complesso immunitario formato dal coniugato legato sarà evidenziato aggiungendo tetrametilbenzidina (TMB) substrato che dà una colorazione blu.

L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione. Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm viene letto utilizzando un fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

## 3 MATERIALI

### 3.1 Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:**  
12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni della TBE/FSME Virus; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **DIL M:**  
1 flacone contenente 100 mL di tampone fosfato (10 mM) per diluire i campioni; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; anti-umane IgG (mezzo di assorbimento RF); colore verde; pronto all'uso; tappo bianco;  $\leq 0,0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **SOLN STOP:**  
1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **WASH BUF 20x:**  
1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH  $7,2 \pm 0,2$ ; tappo bianco; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Coniugato:**  
1 flacone contenente 20 mL di anticorpi IgM anti-umani, coniugati a perossidasi in tampone fosfato (10 mM); colore rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **SUB TMB:**  
1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB),  $< 0,1 \%$ ; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo Positivo:**  
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo rosso; pronto all'uso;  $\leq 0,02\%$  (v/v) MIT.
- **Controllo Cut-off:**  
1 flacone da 3 mL controllo; colore giallo; tappo verde; pronto all'uso;  $\leq 0,02\%$  (v/v) MIT.
- **Controllo Negativo:**  
1 flacone da 2 mL controllo; colore giallo; tappo blu; pronto all'uso;  $\leq 0,0015\%$  (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

### 3.2 Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

### 3.3 Materiali e attrezzature necessari

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

#### 4 MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C.

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

#### 5 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

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

##### 5.1 Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con gli antigeni della TBE/FSME Virus.

Immediatamente dopo la rimozione delle strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2 °C - 8 °C.

##### 5.2 WASH BUF 20x

Diluire WASH BUF 20x 1+19; per esempio: 10 mL WASH BUF 20x + 190 mL di acqua distillata.

Il Tampone diluito (WASH BUF 1x) è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione

##### 5.3 SUB TMB

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

SUB TMB deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se SUB TMB diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

#### 6 PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2 °C - 8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70 °C a -20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

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

##### 6.1 Diluizione dei campioni

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



## 7 PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume del **WASH|BUF|1x** da 300 µL a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

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

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

Regolare l'incubatore a 37 °C ± 1 °C.

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

### 7.1 Misurazione

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

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

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

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

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

## 8 RISULTATI

### 8.1 Validazione del test

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

- **Substrato Bianco (Blank):** Valore di assorbanza < **0,100**
- **Controllo Negativo:** Valore di assorbanza < **0,200 e < Cut-off**
- **Controllo Cut-off:** Valore di assorbanza **0,150 – 1,300**
- **Controllo Positivo:** Valore di assorbanza > **Cut-off**

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

## 8.2 Calcolo dei risultati

Il Cut-off è la media dei valori di assorbanza dei Controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,44 + valore di assorbanza del Controllo Cut-off 0,42  
 $= 0,86 / 2 = 0,43$   
 Cut-off = 0,43

### 8.2.1 Risultati in unità [DU]

$\frac{\text{Assorbanza media del campione} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unità DRG} = \text{DU}]$

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

## 8.3 Interpretazione dei risultati

Cut-off	10 DU	-
Positivo	> 11 DU	Anticorpi contro il patogeno sono presenti. C'è stato un contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino). <u>Dopo la vaccinazione</u> siero conversione dopo vaccinazione Controllare i dati risultanti dalla vaccinazione, ripetere la vaccinazione di base se necessario.
Zona grigia	9 – 11 DU	Anticorpi contro il patogeno non è stato possibile rilevare chiaramente. Si consiglia di ripetere il test con un nuovo campione in 2-4 settimane. <u>Dopo la vaccinazione</u> possibile siero conversione dopo vaccinazione Continuare con la vaccinazione di base oppure ripetere Reazioni a specifiche non possono escludersi
Negativo	< 9 DU	Il campione non contiene anticorpi contro il patogeno. Un precedente contatto con l'antigene (patogeno resp. vaccino) è improbabile. <u>Dopo la vaccinazione</u> nessuna siero conversione dopo vaccinazione Possibile dopo il primo richiamo della vaccinazione di base Pazienti con una risposta immunitaria lenta oppure assente

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.

### 8.3.1 Isotipi degli anticorpi e Stato dell'infezione

Sierologia	Significato
IgM	Caratteristica della risposta primaria dell'anticorpo Alto titolo IgM con basso titolo IgG: → suggerisce una infezione molto recente o acuta Raro: → IgM persistente
IgG	Caratteristica della risposta secondaria dell'anticorpo Può persistere per diversi anni Alto titolo IgG con basso titolo IgM: → può indicare un'infezione passata

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

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

### 9.1 Precisione

Intra dosaggio	n	Media (E)	CV (%)
#1	24	0,490	8,77
#2	24	1,039	7,77
#3	24	0,917	11,74
Inter dosaggio	n	Media (DU)	CV (%)
#1	12	18,14	10,86
#2	12	15,99	13,26
#3	12	2,04	12,56

## 9.2 Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di analiti specifici. La specificità diagnostica è 98,29 % (95 % intervallo di confidenza: 95,07 % - 99,65 %).

## 9.3 Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo alla presenza di analiti specifici. La sensibilità diagnostica è 100 % (95 % intervallo di confidenza: 69,15 % - 100 %).

## 9.4 Possibili interferenze

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

## 9.5 Reattività crociata

Reattività crociata con altri flavivirus non può essere esclusa e deve essere presa in considerazione quando s'interpretano i risultati.

## 10 LIMITAZIONI

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

## 11 PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature simili deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

### 11.1 Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

#### Attenzione



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

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

#### Attenzione



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

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

### 11.2 Smaltimento


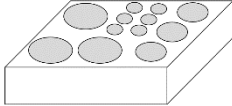




I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i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

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

▪ **Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni**

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

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

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

## 13 SCHEME OF THE ASSAY










## 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 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit <b>Incubate for 1 h at 37 °C ± 1 °C</b> Wash each well three times with 300 µL of <b>WASH   BUF   1x</b>					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubate for 30 min at room temperature (20 °C - 25 °C)</b> Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of <b>WASH   BUF   1x</b>					
<b>SUB   TMB</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Incubate for exactly 15 min at room temperature (20 °C - 25 °C) in the dark</b>					
<b>SOLN   STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts- kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
<b>IVD</b>	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico- diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
<b>REF</b>	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
<b>LOT</b>	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
<b>UDI</b>	Unique Device Identifier	Eindeutige Produktidentifizierung	identificazione unica del dispositivo	identificación única del producto	identification unique des dispositifs
<b>RUO</b>	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité
<b>MTP</b>	Microtiterplate	Mikrotiterplatte	Piastre di Microtitolazione	Placa de Microtitulación	Plaque de Microtitrage
<b>CONJ</b>	Conjugate	Konjugat	Coniugato	Conjugado	Conjugué
<b>CONTROL -</b>	Negative Control	Negativkontrolle	Controllo negativo	Control positivo	Contrôle négatif
<b>CONTROL +</b>	Positive Control	Positivkontrolle	Controllo positivo	Control positivo	Contrôle positif
<b>CUT OFF</b>	Cut off control	Cut off-Kontrolle	Controllo Cut-off	Control Cut-off	Contrôle Cut-off
<b>CAL</b>	Standard or Calibrator	Standard oder Kalibrator	Standard o Calibratore	Estándar o Calibrador	Standard o Etalon
<b>DIL</b>	Sample Dilution Buffer	Probenverdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione	Tampón de Dilución de Muestra	Tampon de Dilution d'Échantillon
<b>DIL A</b>	IgA Sample Dilution Buffer	IgA-Proben- verdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgA	Tampón de Dilución de Muestra IgA	Tampon de Dilution d'Échantillon IgA
<b>DIL M</b>	IgM Sample Dilution Buffer	IgM-Proben- verdünnungspuffer	Tampone di Diluizione del Campione IgM	Tampón de Dilución de Muestra IgM	Tampon de Dilution d'Échantillon IgM
<b>SOLN STOP</b>	Stop solution	Stopplösung	Soluzione bloccante	Solución de parada	Solution d'arrêt
<b>SUB TMB</b>	TMB Substrate solution	TMB-Substratlösung	Soluzione substrato TMB	Solución de sustrato de TMB	Solution de substrat TMB
<b>WASH BUF 20x</b>	Washing Buffer 20x concentrated	Waschpuffer 20x konzentriert	Tampone di lavaggio concentrazione x20	Tampón de lavado concentrado x20	Tampon de lavage concentré 20 x
<b>WASH BUF 1x</b>	20-fold dilution of <b>WASH BUF 20x</b>	20-fach Verdünnung von <b>WASH BUF 20x</b>	Diluizione 20 volte del <b>WASH BUF 20x</b>	Dilución de 20 veces del <b>WASH BUF 20x</b>	Dilution 20 fois du <b>WASH BUF 20x</b>